

RENATA ERNLUND FREITAS DE MACEDO

**UTILIZAÇÃO DE CULTURAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS NO PROCESSAMENTO
DE PRODUTO CÁRNEO FERMENTADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Nelcindo Nascimento
Terra

CURITIBA

2005

À Mariana e ao Maurício, meus
companheiros em todas as horas, nos
diferentes lugares e situações.

AGRADECIMENTOS

Em especial, aos meus pais Renato e Léa, por sempre se mostrarem dispostos a apoiar e incentivar meu crescimento profissional.

Aos meus irmãos, pela importante colaboração, ainda que virtual, na confecção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelcindo Nascimento Terra, pela orientação, valorização do trabalho, disponibilização de material e carinhosa acolhida em Santa Maria.

Ao aluno bolsista e estagiário do Curso de Medicina Veterinária da PUCPR Sérgio Bertelli Pflanzner Jr, pela amizade, empenho, interesse e eficiência na execução de suas atividades.

Aos técnicos dos laboratórios do *Campus* São José dos Pinhais e da Usina Piloto de Alimentos da PUCPR, pelo valoroso auxílio nas análises laboratoriais e atencioso tratamento dispensado durante a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Silvana Maris Cirio, pela amizade e disposição na confecção das lâminas e descrição dos cortes histológicos.

Aos amigos e aos colegas de docência e do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, pelo auxílio, compartilhamento de experiências e oportunidade de trabalho conjunto.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS E QUADROS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	2
1.1.1 Objetivo Geral.....	2
1.1.2 Objetivos Específicos	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 EMBUTIDO CÁRNEO	3
2.1.1 Embutidos Fermentados	4
2.1.1.1 Definição e origem do salame.....	6
2.1.1.2 Fabricação de salame.....	8
2.1.1.3 Desenvolvimento da textura, sabor e aroma do salame	30
2.1.1.4 Antioxidantes naturais em embutidos cárneos fermentados.....	36
2.2 BACTÉRIAS LÁCTICAS	40
2.2.1 Características Gerais	40
2.2.1.1 Gêneros e espécies de bactérias lácticas	43
2.2.2 Atividade Benéfica e Antimicrobiana das Bactérias Lácticas	50
2.2.2.1 Bacteriocinas.....	52
2.2.3 Probióticos	54
2.2.3.1 Mercado dos alimentos probióticos e funcionais	55
2.2.3.2 Microbiota intestinal.....	56
2.2.3.3 Características das bactérias lácticas para uso como probióticos	58
2.2.3.4 Ação benéfica dos probióticos no organismo humano.....	60
2.3 USO DE CULTURAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS EM PRODUTOS CÁRNEOS.....	65
3 MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1 MATERIAL.....	69
3.1.1 Microrganismos	69
3.1.2 Meios de Cultura.....	70
3.1.3 Equipamentos.....	71
3.1.4 Matérias-primas e Ingredientes	72
3.2 MÉTODOS.....	72
3.2.1 Teste de Sensibilidade das Culturas Lácticas aos Sais de Cura (NaCl e NaNO ₂)	72
3.2.2 Teste de Sensibilidade das Bactérias Lácticas Probióticas e das Bactérias Lácticas da Cultura <i>Starter</i> aos Antimicrobianos	73
3.2.3 Produção de Embutido Carneio com Culturas Probióticas.....	75
3.2.3.1 Experimento 1	78
3.2.3.2 Experimento 2	82
3.2.3.3 Experimento 3	84
3.2.4 Resistência de <i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i> ao Baixo pH e na Presença de Sais Biliares.....	86
3.2.4.1 Capacidade de resistência ao baixo pH	87

3.2.4.2 Capacidade de resistência aos sais biliares	87
3.2.5 Métodos de Análise	88
3.2.5.1 Determinação do pH.....	88
3.2.5.2 Determinação de acidez titulável	88
3.2.5.3 Determinação da atividade de água.....	88
3.2.5.4 Determinação da umidade	88
3.2.5.5 Determinação do teor de gordura	89
3.2.5.6 Determinação de proteína	89
3.2.5.7 Determinação da perda de peso.....	89
3.2.5.8 Determinação da redução de diâmetro	89
3.2.5.9 Determinação da oxidação lipídica	90
3.2.5.10 Determinação da cor.....	90
3.2.5.11 Determinações microbiológicas	91
3.2.5.12 Avaliação sensorial.....	92
3.2.5.13 Análise estatística	93
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4.1 SENSIBILIDADE DAS CULTURAS PROBIÓTICAS AOS SAIS DE CURA	94
4.2 SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS FRENTE AOS DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.....	97
4.3 EXPERIMENTO 1.....	100
4.3.1 Determinações Físico-Químicas	100
4.3.1.1 Determinações de pH e acidez	100
4.3.1.2 Determinações de atividade de água, umidade, perda de peso e redução de diâmetro.....	103
4.3.2 Análises Microbiológicas	106
4.3.3 Avaliação Sensorial.....	109
4.4 EXPERIMENTO 2.....	112
4.4.1 Determinações Físico-Químicas	113
4.4.1.1 Determinações de pH e acidez	113
4.4.1.2 Determinações de atividade de água e umidade	115
4.4.2 Análises Microbiológicas	119
4.4.3 Avaliação Sensorial.....	122
4.5 EXPERIMENTO 3.....	127
4.5.1 Determinações Físico-Químicas	127
4.5.1.1 Determinações de pH, atividade de água e umidade.....	127
4.5.1.2 Perdas de peso e diâmetro.....	132
4.5.1.3 Teor de proteínas e lipídeos.....	134
4.5.1.4 Oxidação lipídica.....	136
4.5.1.5 Determinação da cor.....	139
4.5.2 Análises Microbiológicas	143
4.5.3 Avaliação Sensorial.....	148
4.6 RESISTÊNCIA DE <i>LACTOBACILLUS PARACASEI</i> AO BAIXO pH e NA PRESENÇA DE SAIS BILIARES	155
4.6.1 Capacidade de Resistência ao Baixo pH	155
4.6.2 Capacidade de Resistência aos Sais Biliares	157
5 CONCLUSÃO	160
REFERÊNCIAS	162
ANEXOS	180

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PERFIL DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTOS CÁRNEOS.....	8
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SALAME DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO VIGENTE.....	10
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO SALAME.....	10
TABELA 4 - COMPONENTES DAS CULTURAS <i>STARTER</i> PARA A FERMENTAÇÃO CÁRNEA	23
TABELA 5 - MICRORGANISMOS COMUMENTE EMPREGADOS EM PRODUTOS CÁRNEOS FERMENTADOS	26
TABELA 6 – GÊNEROS DE BACTÉRIAS DO GRUPO LÁCTICO E SUA MORFOLOGIA.....	43
TABELA 7 – CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>LACTOBACILLUS</i> EM GRUPOS DE ACORDO COM SUA HABILIDADE FERMENTATIVA E ALGUMAS ESPÉCIES QUE OS COMPÕEM.....	47
TABELA 8 – NOMENCLATURAS DE ALGUMAS ESPÉCIES DE <i>LACTOBACILLUS</i> ..	48
TABELA 9 – REDENOMINAÇÕES PROPOSTAS PARA A ESPÉCIE <i>LACTOBACILLUS</i> <i>CASEI</i>	50
TABELA 10 – PRINCIPAIS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS E SEUS RESPECTIVOS PRODUTOS DE METABOLISMO.....	58
TABELA 11 – FUNCIONALIDADE DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS AVALIADAS NA ESPÉCIE HUMANA.....	64
TABELA 12 – DISCOS DE ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS NO TESTE DE SENSIBILIDADE DAS CULTURAS LÁCTICAS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES	74
TABELA 13 – FORMULAÇÃO BÁSICA UTILIZADA NA FABRICAÇÃO DE EMBUTIDO CÁRNEO ADICIONADO DE CULTURAS PROBIÓTICAS	75
TABELA 14 - CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR UTILIZADAS NA CÂMARA DE INCUBAÇÃO DURANTE O PERÍODO DE MATURAÇÃO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS DO EXPERIMENTO	181
TABELA 15 - CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR UTILIZADAS NA CÂMARA DE INCUBAÇÃO DURANTE O PERÍODO DE MATURAÇÃO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS DO EXPERIMENTO	283
TABELA 16 - RESULTADOS OBTIDOS NO TESTE DE SUSCETIBILIDADE DAS CULTURAS LÁCTICAS AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO	98
TABELA 17 - CONTAGEM DE <i>PEDIOCOCCUS</i> E <i>LACTOBACILLUS</i> EM MEIO DE CULTURA COM E SEM A ADIÇÃO DE TETRACICLINA (10 MG/L).....	99
TABELA 18 - MÉDIAS DAS NOTAS ATRIBUÍDAS PELOS PROVADORES AOS EMBUTIDOS FERMENTADOS EM CÂMARA DE MATURAÇÃO POR 25 DIAS - EXPERIMENTO 1	109
TABELA 19 – MÉDIAS DAS NOTAS ATRIBUÍDAS PELOS PROVADORES AOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS O PROCESSAMENTO (TEMPO 28 DIAS) E APÓS 56 DIAS DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (TEMPO 84 DIAS) - EXPERIMENTO 2	122
TABELA 20 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE TBA NOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS O PROCESSAMENTO E DURANTE A ESTOCAGEM – EXPERIMENTO 3.....	137

TABELA 21 – VARIAÇÃO DO CROMA L* NOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS PROCESSAMENTO E DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO – EXPERIMENTO 3	140
TABELA 22 – VARIAÇÃO DA COR VERMELHA (a*) NOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS PROCESSAMENTO E DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO – EXPERIMENTO 3	141
TABELA 23 – VARIAÇÃO DA COR AMARELA (b*) NOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS PROCESSAMENTO E DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO – EXPERIMENTO 3	142
TABELA 24 – MÉDIAS DAS NOTAS OBTIDAS NAS AVALIAÇÕES SENSORIAIS REALIZADAS APÓS O PROCESSAMENTO E DURANTE O ARMAZENAMENTO DOS EMBUTIDOS - EXPERIMENTO 3	149

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPLEXO HEME DA MIOGLOBINA	13
FIGURA 2 – FORMAS DA MIOGLOBINA EM CARNES FRESCAS, CURADAS E COZIDAS	14
FIGURA 3 – REAÇÃO DE COR EM CARNES CURADAS	15
QUADRO 1 – BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO (BPF) E VALORES PARA O CONTROLE DE PONTOS CRÍTICOS NO PROCESSAMENTO DE SALAME	30
FIGURA 4 – MORFOLOGIA CELULAR DE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> (A), <i>LACTOBACILLUS PARACASEI</i> SSP. <i>PARACASEI</i> (B) E <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> SSP. <i>RHAMNOSUS</i> (C) EM MICROFOTOGRAFIA DE TRANSMISSÃO DE LUZ (1.000 X) E COLORAÇÃO DE GRAM.....	70
FIGURA 5 - PEÇAS DE EMBUTIDOS CÁRNEOS ARMAZENADOS EM CÂMARA DE INCUBAÇÃO B.O.D. PARA INÍCIO DA FERMENTAÇÃO E SECAGEM	77
FIGURA 6 – FLUXOGRAMA BÁSICO DE PROCESSAMENTO DE PRODUTO CÁRNEO FERMENTADO ADICIONADO DE CULTURAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS.....	78
FIGURA 7 – CRESCIMENTO DAS CEPAS DE LACTOBACILOS TESTADOS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO (NaCl)	94
FIGURA 8 - CRESCIMENTO DAS CEPAS DE LACTOBACILOS TESTADOS EM ÁGAR MRS SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRITO DE SÓDIO (NaNO ₂).....	95
FIGURA 9 – CRESCIMENTO DAS CEPAS DE LACTOBACILOS TESTADOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM 3% DE CLORETO DE SÓDIO (NaCl) E 200 ppm DE NITRITO DE SÓDIO (NaNO ₂).....	96
FIGURA 10 – COLÔNIAS DE <i>PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS</i> (1) E DE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> (2) EM ÁGAR MRS ADICIONADO DE 5 MG/ L DE TETRACICLINA	100
FIGURA 11 – VARIAÇÕES DE pH E ACIDEZ DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS ADICIONADOS DE CULTURAS PROBIÓTICAS DURANTE 25 DIAS DE MATURAÇÃO E SECAGEM – EXPERIMENTO 1	101
FIGURA 12 – VALORES DE ATIVIDADE DE ÁGUA, UMIDADE, PERDA DE PESO E REDUÇÃO DE DIÂMETRO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS EM 25 DIAS DE PROCESSAMENTO – EXPERIMENTO 1	104
FIGURA 13 - CONTAGEM DOS <i>LACTOBACILLUS</i> PROBIÓTICOS, <i>PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS</i> E <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i> DURANTE O PROCESSAMENTO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS – EXPERIMENTO 1	107
FIGURA 14 – PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS 25 DIAS DE PROCESSAMENTO – EXPERIMENTO 1	110
FIGURA 15 – APARÊNCIA GERAL DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS 25 DIAS DE PROCESSAMENTO – EXPERIMENTO 1	111
FIGURA 16 – EVOLUÇÃO DO pH E DA ACIDEZ DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS COM ADIÇÃO DE <i>L. PARACASEI</i> E <i>L. CASEI</i> DURANTE O PERÍODO DE PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO REFRIGERADO – EXPERIMENTO 2	114

FIGURA 17 - VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA E DA UMIDADE DOS EMBUTIDOS CÁRNEOS ADICIONADOS DE <i>L. PARACASEI</i> E <i>L. CASEI</i> DURANTE 28 DIAS DE PROCESSAMENTO E 56 DIAS DE ARMAZENAMENTO – EXPERIMENTO 2.....	116
FIGURA 18 – CONTAGEM DE <i>LACTOBACILLUS</i> , <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i> E <i>PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS</i> DURANTE O PROCESSAMENTO E ESTOCAGEM DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS – EXPERIMENTO 2 ..	120
FIGURA 19 – APARÊNCIA GERAL DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS DOS TRATAMENTOS 1, 2 E 3 NO INÍCIO DO PROCESSAMENTO, AOS 21 DIAS DE PROCESSAMENTO E APÓS 56 DIAS DE ARMAZENAMENTO A 4° C – EXPERIMENTO 2.....	124
FIGURA 20 – CONFIGURAÇÃO DOS ATRIBUTOS AVALIADOS NOS EMBUTIDOS FERMENTADOS AO FINAL DO PROCESSAMENTO (TEMPO 28 DIAS) E APÓS ESTOCAGEM DE 56 DIAS SOB REFRIGERAÇÃO (TEMPO 84 DIAS) – EXPERIMENTO 2	125
FIGURA 21 – EVOLUÇÃO DO pH, ATIVIDADE DE ÁGUA E UMIDADE DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS DURANTE 28 DIAS DE PROCESSAMENTO E 150 DIAS DE ESTOCAGEM SOB REFRIGERAÇÃO (TEMPO 178 DIAS) – EXPERIMENTO 3	128
FIGURA 22 - PERDA DE PESO E REDUÇÃO DE DIÂMETRO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS AO LONGO DO PERÍODO DE PROCESSAMENTO (28 DIAS) – EXPERIMENTO 3	133
FIGURA 23 – VALORES MÉDIOS DE PROTEÍNAS E LIPÍDEOS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS NO INÍCIO E FIM DO PROCESSAMENTO (28 DIAS) E APÓS ARMAZENAMENTO REFRIGERADO DE 150 DIAS (178 DIAS) – EXPERIMENTO 3	135
FIGURA 24 – EVOLUÇÃO NA CONTAGEM DA CULTURA PROBIÓTICA E DA CULTURA <i>STARTER</i> DURANTE O PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS – EXPERIMENTO 3	144
FIGURA 25 – ASPECTO DAS FATIAS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS DOS TRATAMENTOS 1, 2, 3 E 4 APÓS 150 DIAS DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (TEMPO 178) – EXPERIMENTO 3	152
FIGURA 26 - CORTES HISTOLÓGICOS DE FRAGMENTOS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS 150 DIAS DE ARMAZENAMENTO CORADOS PELAS TÉCNICAS DE TRICRÔMICO DE SHORR (1 E 2) E TRICRÔMICO DE MALLORY (3) - MICROFOTOGRAFIAS DE TRANSMISSÃO DE LUZ (FOTO 1 - 40 X, FOTO 2 - 10 X E FOTO 3 - 10 X)	154
FIGURA 27 – SOBREVIVÊNCIA DE <i>LACTOBACILLUS PARACASEI</i> DURANTE 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO EM SOLUÇÃO SALINA ÁCIDA A 37°C	156
FIGURA 28 – CRESCIMENTO DE <i>LACTOBACILLUS PARACASEI</i> EM CALDO MRS CONTENDO 0%, 0,15% E 0,30% DE SAIS BILIARES DURANTE 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO A 37°C	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AOAC	- Association of Official Analytical Chemists
ANOVA	- Análise de variância
ATCC	- American Type Culture Collection
Aw	- Atividade de água
CCT	- Coleção de Culturas Tropicais
Eh	- Potencial de óxido-redução
nm	- Nanômetro
μ	- Mícron
pi	- Ponto isoelétrico
pK	- Ponto de dissociação
p/v	- Peso/ volume
rpm	- Rotações por minuto
UFC	- Unidades formadoras de colônia

RESUMO

Com o intuito de oferecer ao consumidor novas opções de produtos que contenham microrganismos probióticos e viabilizar o uso dessas culturas no ambiente cárneo, desenvolveu-se um embutido fermentado, análogo ao salame, adicionado de culturas lácticas probióticas. Foram utilizadas três diferentes espécies de *Lactobacillus* tradicionalmente empregadas em bebidas lácteas e conhecidas por suas propriedades probióticas. Previamente ao desenvolvimento do produto, foi verificada a resistência das cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* aos sais de cura, utilizando concentrações de até 3% de cloreto de sódio e 200 ppm de nitrito de sódio, sendo observada a sobrevivência das culturas em todas as concentrações testadas. Para o desenvolvimento do produto cárneo, foram conduzidos três experimentos que avaliaram o crescimento e o efeito da utilização das culturas de *Lactobacillus* sobre características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos embutidos. A adição das cepas probióticas à massa dos produtos foi realizada sob a forma concentrada, em caldo MRS previamente centrifugado, ao final da mistura dos ingredientes, logo após a adição da cultura *starter* comercial. No Experimento 1, os embutidos foram processados por um período de 25 dias em câmara de maturação com temperatura e umidade relativa do ar controladas. Ficou constatada que a presença das culturas probióticas promoveu redução mais rápida do pH dos produtos em relação ao tratamento controle, proporcionando gosto ácido mais intenso na avaliação sensorial, principalmente para cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, que tornou o sabor dos embutidos menos apreciado. A presença das espécies probióticas também causou redução no crescimento de *Staphylococcus xylosus* da cultura *starter* gerando efeito sobre a cor e a textura dos produtos, que apresentaram tonalidade mais clara e consistência mais macia. Por outro lado, o desenvolvimento da bactéria láctica *Pediococcus pentosaceus*, integrante da cultura *starter*, não sofreu influência negativa pela adição dos probióticos nos embutidos. No Experimento 2, o efeito da utilização das cepas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* nos embutidos foi avaliado durante o período de 28 dias de processamento em câmara de maturação e 56 dias de armazenamento em embalagem a vácuo sob refrigeração. O uso das duas culturas proporcionou resultados semelhantes nas determinações físico-químicas e sensoriais dos embutidos, porém a viabilidade celular de *Lactobacillus paracasei* durante os períodos de processamento e armazenamento dos embutidos mostrou-se superior à de *Lactobacillus casei*. No sentido de melhorar as características sensoriais e reduzir sinais de oxidação lipídica nos embutidos, o terceiro experimento foi conduzido, sendo testada a adição de extrato hidroetanólico de marcela do campo, além da cepa de *Lactobacillus paracasei* nos produtos durante 28 dias de processamento e 150 dias de armazenamento refrigerado sob condições de vácuo. A ação antioxidante do extrato vegetal sobre os lipídeos foi comprovada somente nos embutidos adicionados concomitantemente com a cultura probiótica. O uso conjunto do probiótico e do antioxidante também proporcionou aos embutidos o melhor perfil sensorial entre os tratamentos testados. A cultura de *Lactobacillus paracasei* apresentou desenvolvimento estável durante 150 dias de armazenamento do produto, mantendo o número de células viáveis superior a 10^8 UFC/ g até o final da estocagem e mostrando propriedade probiótica de crescer em meio com pH 3,0 e 0,3% de sais biliares por um período de 4 horas, o que confirma sua possibilidade de sobrevivência durante a passagem pelo estômago e intestino delgado.

Palavras-chave: probióticos, *Lactobacillus paracasei*, salame, embutido fermentado.

ABSTRACT

In order to offer to the consumers new probiotic type products and make possible the use of probiotic cultures in meat environment a fermented sausage containing probiotic lactic acid bacteria was developed. Three different *Lactobacillus* species traditionally used in milk beverages and known by their probiotics properties had been used. Previously to the development of the product, the resistance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* to curing salts was verified, using concentrations up to 3% sodium chloride and 200 ppm sodium nitrite. All *Lactobacillus* strains showed survival in the tested curing salt concentrations. For the development of the fermented sausage three different experiments were carried out with the intention to evaluate the growth and the effect of the use of *Lactobacillus* strains on physical and chemical, microbiological and sensory characteristics of the product. Probiotic strains were grown in MRS broth and the viable cells were concentrated by centrifugation to their addition into the raw sausage material at the end of the mixture of ingredients, after the addition of commercial starter culture. In Experiment 1, the sausages were fermented and ripened for 25 days under controlled temperature and relative humidity conditions. The presence of probiotics strains resulted in faster and higher pH decrease compared to control sausage, providing stronger acid taste, mainly for *Lactobacillus rhamnosus* sausage that showed lower scores for flavor in the sensory evaluation. The probiotic strains also decreased the growth of starter culture *Staphylococcus xylosus* influencing the color and the texture of the products that had presented lighter color and lower consistency. On the other hand, the development of *Pediococcus pentosaceus* starter culture was not affected by the presence of probiotic strains. In Experiment 2, the effect of the use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* in the sausages was evaluated during 28 days ripening and 56 days vacuum storage under refrigerated conditions. The use of *L. casei* and *L. paracasei* provided similar results for physical and chemical analysis and sensory evaluation however the viable cells count of *Lactobacillus paracasei* during the ripening and storage was higher than the *Lactobacillus casei*. With the intention to improve sensory profile and reduce lipid oxidation in sausages a third experiment was carried out with the addition of hydroethanolic extract of marcela do campo (*Achyrocline satureioides*) and *Lactobacillus paracasei* strain in sausages. The products were processed for 28 days of fermentation and ripening and stored for 150 days under vacuum and cooled environment. The antioxidant effect of the plant extract was confirmed only in sausages added concomitantly of probiotic culture and extract of marcela do campo. The simultaneous use of *Lactobacillus paracasei* and the natural antioxidant provided to sausages the greatest sensory profile among the treatments. *Lactobacillus paracasei* maintained viability throughout 150 days of storage, remaining viable cells level higher than 10^8 UFC/ g at the end of storage. The strain also showed growth in phosphate-buffered saline adjusted to pH 3,0 and MRS broth supplemented with 0.3% bile salts for 4 hours, indicating its possible ability to survive the passage through the stomach and the small intestine.

Key-words: probiotic, *Lactobacillus paracasei*, fermented sausage.

1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação dos consumidores em conhecer as características dos alimentos que consomem tem conduzido ao desenvolvimento de produtos que promovam a saúde e o bem-estar, além de sua função de nutrição (TYÖPPÖNEN et al., 2003). Esses alimentos que geram efeitos benéficos à saúde humana aliados a ação nutricional são denominados funcionais. Seu efeito deve-se à adição de ingredientes ativos, à remoção ou substituição de substâncias indesejáveis em sua composição. Estima-se que o consumo de alimentos funcionais na Europa totalize 5% do conteúdo total de alimentos consumidos (ERKKILÄ et al., 2001b).

A disseminação do conceito de promoção da saúde utilizada pela indústria de alimentos iniciou nos anos 60, havendo nos anos 70 a tendência de remover ou substituir nos alimentos componentes “não saudáveis” como açúcar, sal e gordura. Essa tendência manteve-se nos anos 80, principalmente para alguns aditivos. Nos anos 90, componentes promotores da saúde como vitaminas, antioxidantes, fibras e probióticos passaram a ser adicionados aos alimentos, tendo sido comprovadas as ações benéficas dos alimentos funcionais a partir do ano 2000. Na Europa, o mercado de alimentos funcionais é composto por 60% de produtos lácteos, 25% de pastas à base de gordura, 10% de produtos de panificação e cereias e 5% de bebidas (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Os probióticos ocupam grande espaço entre os alimentos funcionais, representando 65% do total comercializado mundialmente (SANTOS; FERREIRA; COSTA, 2003). Os microrganismos benéficos têm sido aplicados principalmente em bebidas lácteas, mas também em produtos à base de cereais, fórmulas para alimentação infantil, sucos de frutas e sorvetes (BEDJER, 2004).

Na indústria cárnea, o uso de probióticos mostra-se mais promissor nos produtos crus fermentados, haja vista serem fabricados com carne crua e consumidos sem prévio aquecimento, o que causaria a morte dos microrganismos (ERKKILÄ et al., 2001a). Os embutidos cárneos como o salame são muitas vezes considerados produtos menos saudáveis devido ao seu conteúdo de gordura, aditivos e especiarias. Nesse sentido, a adição de probióticos a esses alimentos poderia trazer os benefícios à saúde associados às bactérias lácticas e contribuir para o aumento do consumo desses produtos por uma parcela da população preocupada com a manutenção da saúde.

Porém, a incorporação de bactérias probióticas aos produtos cárneos também representa um grande desafio tecnológico devido à conhecida sensibilidade desses microrganismos ao sal, às especiarias e às demais substâncias utilizadas em sua formulação (SAMESHIMA, et al., 1998; ANDERSEN, 1998). Além disso, essa adição pressupõe o uso de microrganismos que resistam ao processo de fermentação da carne e que permaneçam viáveis para sobreviver à passagem pelo estômago e intestino delgado e exercer suas ações benéficas no organismo (LÜCKE, 2000).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um produto cárneo fermentado, análogo ao salame, adicionado de bactérias lácticas probióticas e verificar o efeito dessa adição sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do produto.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- testar a capacidade das culturas probióticas *Lactobacillus paracasei*, *L. casei* e *L. rhamnosus*, tradicionalmente utilizadas em derivados lácteos, em sobreviver às concentrações de sais de cura usualmente empregadas nos produtos cárneos fermentados;
- avaliar a capacidade de *Lactobacillus paracasei*, *L. casei* e *L. rhamnosus* de crescer e manter-se viáveis em produto cárneo;
- verificar a influência da adição de *Lactobacillus paracasei*, *L. casei* e *L. rhamnosus* sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do produto cárneo fermentado e selecionar a cepa mais adequada ao produto;
- averiguar o efeito da utilização de extrato hidroetanólico de marcela do campo com propriedade antioxidante sobre a rancificação lipídica, crescimento da cultura láctica e atributos sensoriais do produto cárneo;
- testar a capacidade probiótica de *Lactobacillus paracasei* em resistir ao baixo pH e aos sais biliares.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EMBUTIDO CÁRNEO

Os processos de secagem, fermentação e defumação podem ser considerados como os mais antigos métodos de conservação da carne. Esses processos eram utilizados nas regiões onde, por razões climáticas, não poderiam ser aplicadas outras técnicas de conservação (MONFORT, 2002).

Embutido é um alimento que se prepara com carne picada e condimentada, proporcionando forma simétrica. A palavra embutido deriva de *salsus* que em latim significa salgado ou carne conservada por sal. A elaboração de embutidos iniciou-se como um simples processo de salga e secagem para a conservação da carne fresca que não poderia ser consumida imediatamente. Os antepassados descobriram que esses produtos tinham sua conservação e sabor favorecidos com a adição de especiarias e outros condimentos. O produto era manuseado dentro de invólucros construídos com o trato intestinal de animais (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

Dependendo da região geográfica, o produto ganha textura e sabores específicos para agradar o paladar local, sendo que muitos produtos atualmente conhecidos devem seus nomes aos locais de procedência. Em sua grande maioria, os embutidos atuais surgiram de precursores do velho mundo. Os embutidos cozidos procedem do norte da Europa, onde o clima era suficientemente frio para permitir sua conservação e armazenamento. Os embutidos secos, por outro lado, se estabeleceram na Europa Meridional, onde o produto mais estável a temperaturas moderadas era mais apropriado (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

Na Europa Ocidental existe uma grande variedade de embutidos cárneos curados que podem ser classificados em produtos de peça inteira ou picada, defumados ou dessecados naturalmente, produtos acidificados, produtos com ou sem adição de fungos, produtos crus ou cozidos e produtos de massa granulosa ou pastosa. Os produtos crus curados tradicionais do norte da Europa caracterizavam-se pelo baixo pH e defumação, enquanto que os produtos do sul da Europa poderiam ser ácidos ou pouco ácidos, defumados ou não, cujo processo de conservação estava condicionado às condições climáticas da região (MONFORT, 2002).

A demanda por novos produtos influenciou grandemente o desenvolvimento da indústria de embutidos. Os avanços nos métodos de refrigeração, envase e distribuição facilitaram a inclusão de pequenos fabricantes locais nos grandes mercados. No entanto, a indústria de embutidos encontra dificuldades em alcançar uma parcela da população, devido a informações que sugerem consequências danosas no consumo desse tipo de alimento.

A elaboração de embutidos antes tomada como uma arte é agora uma ciência altamente sofisticada, surgindo a cada dia novas tecnologias desde o processamento, desenvolvimento de equipamentos até a forma de apresentação e distribuição dos produtos. Essas características fazem da elaboração de embutidos uma das áreas mais dinâmicas da indústria cárnea (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

Os embutidos crus, curados e fermentados, como o salame, encaixam-se perfeitamente nas tendências atuais de consumo da população devido à sua facilidade de preparação (prontos para consumo), facilidade de conservação, versatilidade de uso, individual ou como acompanhamento em preparações culinárias, caráter nutritivo e variadas formas de apresentação e sabor (MONFORT, 2002).

2.1.1 Embutidos Fermentados

Após a experiência com a criação de animais datada de milhares de anos e muitas décadas de intensas pesquisas sobre os processos de fermentação e secagem da carne, a fabricação de embutidos fermentados ainda envolve muita ciência, um pouco de arte e uma certa quantia de mística (HAND, 1997, citado por INCZE, 1998).

A produção de embutidos fermentados no mundo perde-se na Antigüidade devido à necessidade de conservação da carne para seu posterior consumo. As primeiras civilizações faziam uso da salga para essa finalidade, sendo que inicialmente salgavam-se peças completas ou grandes pedaços de carne, passando posteriormente à salga e à condimentação de peças menores, cortadas em pedaços e embutidas em envoltórios flexíveis no intuito de tornar o processo de conservação mais rápido (FROSI, 2002; BERAQUET, 2005).

Por tratar-se de um alimento rico em proteínas e com alto teor de água, a carne apresenta alta perecibilidade e curto período de vida útil, devendo ser preservada mediante o uso de técnicas de conservação. A fermentação mostra-se como um eficiente método de conservação para a carne, porém raramente é utilizada isoladamente. A preservação da carne geralmente é obtida pela combinação de fermentação, desidratação e salga.

Esses métodos de conservação constituem a base das técnicas tradicionais de preservação da carne, tendo sido empregados antes mesmo da compreensão científica de sua ação sobre o tecido muscular (CAMPBELL-PLATT, 1995).

A fermentação cárnea é um processo dinâmico, caracterizada por contínuas alterações bioquímicas, biofísicas e microbiológicas, empregada há muitos anos para a conservação da carne. Ultimamente, tem-se tentado conhecer, monitorar e melhorar o processo visando a obtenção de produtos de qualidade superior (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

A salga, a cura e a secagem da carne fresca demonstraram ser meios efetivos de controlar o crescimento microbiano, haja vista que a microbiota da carne salgada é diferente daquela da carne fresca. Os sais de cura criam um microambiente na massa cárnea que favorece o crescimento de tipos específicos de bactérias gram positivas, inibindo o crescimento da flora contaminante da carne fresca. Essa inversão microbiana que ocorre durante a salga e o processo de cura foi a origem accidental de todos os produtos cárneos fermentados (BERAQUET, 2005).

Os embutidos cárneos fermentados são aqueles que sofrem uma rápida fermentação inicial com posterior desidratação parcial, embutidos em envoltórios naturais ou artificiais, defumados ou não. Esses produtos dispensam refrigeração e possuem grande estabilidade quando comparados com outros produtos cárneos, obtidos pela combinação de diversos fatores que atuam como obstáculos ao crescimento microbiano indesejável (FROSI, 2002). De acordo com BERAQUET (2005), os embutidos fermentados são produtos resultantes da fermentação láctica da carne crua triturada e salgada, misturada à gordura em forma de cubos ou triturada, adicionada de especiarias, embutida e processada em envoltórios naturais ou sintéticos.

Os embutidos fermentados se submetem a uma dessecação parcial, cura e maturação, envolvidos por tripas naturais ou artificiais, defumados ou não, e conservados por maior tempo. Compreendem os embutidos elaborados com carne suína, bovina ou ambas, que se caracterizam por sabor forte e picante, originado devido à produção de ácidos por fermentação microbiana (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

Os embutidos fermentados podem ser classificados em secos e semi-secos. A formulação em carnes, tamanho das partículas, intensidade do sabor, tipo da tripa utilizada e tempo de conservação são variáveis que contribuem para a existência de uma ampla variedade desses embutidos (LÜCKE, 2000).

Os embutidos semi-secos diferem dos secos por possuírem sabor mais picante, textura mais branda e menos rugosa, contendo aproximadamente 50% de água enquanto os secos possuem 35% de umidade permanecendo em maturação por 10 a 100 dias (PRÄNDL et al., 1994).

O sabor picante dos produtos semi-secos resulta da presença de ácidos orgânicos predominantes nos produtos comercializados com menos de duas semanas de maturação, pois a partir desse período iniciam-se processos de oxidação desses ácidos com conseqüente redução do sabor ácido à medida em que se prolonga a maturação (LÜCKE, 2000).

Esses embutidos não são produtos tipo emulsão, sendo melhor classificados como mesclados ou misturados, para os quais o tamanho das partículas cárneas é muito importante na obtenção das características desejáveis. Nos produtos secos e semi-secos não se deseja a extração de proteínas miofibrilares durante o processo de elaboração, o que ocorre na fabricação de embutidos emulsionados nos quais o sal é incorporado à carne no início do processo para essa finalidade. Por outro lado, nos embutidos dessecados, o sal é adicionado ao final do processo de mistura da massa, auxiliando a eliminação ordenada de água do interior do produto durante sua elaboração (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

2.1.1.1 Definição e origem do salame

Entende-se por salame o produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho e ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, cru, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado. A presença de mofos característicos na superfície é conseqüência natural do processo de fabricação (BRASIL, 2000).

A origem da palavra salame é incerta. Muitos autores descrevem que o termo teve origem do latim com significado de sal, enquanto outros autores atribuem sua denominação à cidade de Salame localizada no Chipre. A origem dos salames parece estar relacionada aos países do Mediterrâneo, do sul da Europa, de onde saíram para serem posteriormente levados aos demais países do continente europeu (ZEUTHEN, 1995). No Brasil, o termo salame é genérico e geralmente aplicado aos embutidos fermentados, que se diferenciam pela espécie animal da carne utilizada, forma de preparação da gordura, quantidade de sal e tipo de condimentação utilizados, natureza e dimensão do envoltório empregado, presença ou não de

bolor superficial e pelas condições de tempo e temperatura aplicadas durante a fermentação (BERAQUET, 2005).

Para HUGAS; MONFORT (1997), o salame pode ser definido como a mistura de carne triturada e gordura com sal, nitrato e/ou nitrito, açúcar e condimentos que após embutimento é submetida a processo de fermentação e secagem, proporcionando ao produto final grande vida de prateleira, como consequência da inibição de bactérias patogênicas e deteriorantes.

Internacionalmente, os salames são classificados em dois grandes grupos de acordo com a tecnologia de fabricação e o pH final do produto. Os salames do norte da Europa são elaborados com carne bovina e suína, submetidos a uma fermentação de curta duração e rápido abaixamento de pH. Possuem como principal característica o sabor picante, proporcionado pelo pH final inferior a 5,0. Os salames do sul da Europa ou do Mediterrâneo apresentam em sua formulação, predominantemente, carne suína. Sua fermentação é de longa duração, os valores de pH são sempre superiores a 5,0, os quais juntamente com a adição de especiarias, conferem ao produto aroma e sabor envolventes. O salame tipo italiano, fabricado no Brasil, enquadra-se no segundo grupo, pois é, predominantemente, obtido a partir de carne suína, maturado por um período aproximado de 30 dias, apresentando aroma e sabor suaves e pH em torno de 5,4 (TERRA, 2003; ZANARDI et al., 2004).

No Brasil, a produção de salame originou-se a partir dos conhecimentos e processos de produção trazidos pelos imigrantes italianos, que ao se instalaram na região sul encontraram condições climáticas favoráveis e iniciaram a produção artesanal, dando origem às pequenas fábricas. A produção e o consumo nacional de salame estão concentrados na região sul, especialmente no Rio Grande do Sul. TERRA; FRIES; TERRA (2004) citam que o volume diário da produção de salame no Brasil é de 110 a 120 toneladas. Porém, apesar da escassez de números oficiais, acredita-se que a produção caseira represente cerca de 50% do total da produção nacional, sendo o produto identificado como “salame colonial” o de maior volume de comercialização, haja vista sua facilidade de fabricação. Esse cenário sobre a produção nacional de salame mostra que o mercado é ocupado tanto por grandes empresas que utilizam equipamentos e técnicas de produção avançadas, concentradas em um pequeno número de indústrias, quanto por um grande número de fábricas que processam produtos artesanais em pequena escala, utilizando tecnologia semelhante à dos primeiros imigrantes que chegaram ao País (FROSI, 2002).

Ricos em variedades, os salames atingem na Alemanha 330 tipos diferentes e na Itália englobam quase mil variedades. No Brasil, os tipos mais conhecidos são italiano, milano, hamburguês, friolano, calabrês, alemão, salaminho e napolitano (TERRA, 1998). Outros produtos fermentados com significativa produção são o presunto tipo Parma, o copa e mais recentemente o peperoni, ainda que em volumes muito inferiores aos produzidos pelos países com tradição nesses produtos (FROSI, 2002).

A Tabela 1 mostra a produção brasileira de produtos cárneos e a posição do salame na produção total.

TABELA 1 – PERFIL DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTOS CÁRNEOS

PRODUTO CÁRNEO	PRODUÇÃO (%)
Lingüiça	25,0
Mortadela e Salsichão	17,0
Salsicha	15,0
Apresuntado	8,0
Presunto	7,5
Hambúrger	6,0
Salame	3,0
Charque	12,0
Outros	6,5

FONTE: TERRA, 1998.

Pela análise da tabela, observa-se a grande predominância dos produtos curados consumidos no Brasil. Por tratar-se de um produto de maior valor econômico e que requer maior tecnologia para seu processamento, entre os produtos cárneos citados, o salame é o menos consumido. Porém, atualmente, em nível mundial, muitos são os estudos envolvendo a fabricação de produtos cárneos fermentados, como o salame, visando desde a substituição de matérias-primas para diminuição de custos até a introdução de microrganismos benéficos à saúde humana.

2.1.1.2 Fabricação de salame

De uma forma simples, a fabricação de salame ocorre em duas etapas distintas. Na etapa inicial, ocorre a fermentação e acidificação com o desenvolvimento de características sensoriais de cor e na etapa final, a desidratação, que além de reforçar algumas propriedades sápidas, reduz a atividade em níveis prejudiciais aos microrganismos responsáveis pela deterioração do produto (TERRA, 2003).

As transformações ocorridas no salame durante sua fabricação podem ser resumidas nas seguintes etapas: alteração na microflora inicial, decréscimo nos valores de pH, redução do nitrato a nitrito para a formação de mioglobina nitrosa, solubilização e gelificação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, proteólise, lipólise e fenômenos oxidativos, além da desidratação (LIZASCO; CHASCO; BERIAIN, 1999).

O processo fermentativo ocupa posição de alta relevância na fabricação de salame, pois participa diretamente na geração de cor, sabor, aroma, textura e vida útil (TERRA, 1998).

a) Matérias-primas

Na escolha da matéria-prima, prefere-se as carnes mais intensamente coradas de animais de maior idade, sãos, bem nutridos e descansados (PARDI et al., 1996). A coloração vermelho escura do salame constitui um atributo importante de qualidade, devendo a esse fato o uso de carne bovina nas formulações, visto conter maior teor de mioglobina que a carne suína.

O pH das carnes utilizadas não deverá exceder 5,8, estando preferencialmente situado entre 5,4 e 5,8, quando adquirem estrutura aberta na qual as fibras musculares se retraem devido ao suco exsudado. Esse suco acumula-se nos espaços interfibrilares, aumentando o volume da peça e permitindo melhor penetração de sal e sais de cura. Outra consequência do baixo pH é a maior perda de umidade durante os processos de maturação, defumação e dessecação. Essas condições facilitam a conservação do produto e reduzem o perigo microbiológico. Carnes com pH superior a 6,2 não são adequadas à elaboração de embutidos crus, mesmo quando adicionadas de rebaixadores de pH (PARDI et al., 1996).

Segundo PRÄNDL et al. (1994), carnes com pH elevado do tipo DFD (escura, firme e seca) podem prejudicar o abaixamento de pH no embutido, favorecendo a multiplicação de bactérias deteriorantes. Por outro lado, o uso de grandes quantidades de carne PSE (pálida, suave e exsudativa), que possuem baixo pH, pode acarretar defeitos de dessecação no produto final por uma rápida perda de umidade, além de tornar a cor do produto mais clara que a tradicional.

A proporção de carne suína no salame deve ser de no mínimo 60%, com exceção do salame hamburguês cujo teor mínimo permitido é de 50%.

Além da carne suína, define-se como ingredientes obrigatórios dos salames o toucinho e os sais de cura (sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio). O toucinho a ser empregado deve proceder unicamente de animais depilados (BRASIL, 2000).

Por tratar-se de um produto de maior período de vida útil e sem necessidade de refrigeração no armazenamento, o salame deve apresentar características físico-químicas bem definidas para garantir sua integridade, cujos limites máximos e mínimos estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SALAME DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO VIGENTE

CARACTERÍSTICAS	VALORES
Atividade de água (Aw)	máximo 0,92
Umidade (%)	máximo 40
Gordura (%)	máximo 35
Proteína (%)	mínimo 20
Carboidratos totais (%)	máximo 4,0 *

FONTE: BRASIL, 2000; *BRASIL, 2003a.

De acordo com a legislação vigente, no salame também podem ser adicionados ingredientes opcionais, como a carne bovina, leite em pó, açúcares, maltodextrinas, proteínas lácteas, aditivos intencionais, vinho, condimentos, aromas e especiarias e substâncias glazeantes para revestimento externo. A Tabela 3 mostra a composição química de salame segundo FRANCO (2001).

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE SALAME

COMPONENTES	QUANTIDADES
Proteínas (g/ 100g)	24,04
Glicídeos (g/ 100g)	0,00
Lipídeos (g/ 100g)	22,36
Cálcio (mg/ 100g)	10,00
Fósforo (mg/ 100g)	260,00
Ferro (mg/ 100g)	2,60
Calorias (kcal/ 100g)	297,40

FONTE: FRANCO, 2001.

Para o salame italiano, um dos tipos mais consumidos no Brasil, o teor máximo de atividade de água deve ser de 0,90, umidade máxima de 35%, gordura máxima de 32%, proteína mínima de 25% e teor de carboidratos totais de no máximo 4,0% (BRASIL, 2000;

BRASIL, 2003a). Conforme TERRA (2003), o salame tipo italiano deverá apresentar pH final de 5,2 a 5,4 e atividade de água em torno de 0,87.

A temperatura das matérias-primas constitui um fator de grande importância durante as operações de moagem e mistura dos ingredientes, sendo recomendada nessas operações temperaturas baixas de refrigeração que variam de +1 a +4° C (FROSI, 2002).

b) Cura

Historicamente, a cura pode ser definida como a adição de sal à carne para fins de preservação. No decorrer dos tempos, outras substâncias foram sendo adicionadas. Entende-se por cura a adição de sal (cloreto de sódio), nitrato e/ou nitrito e demais ingredientes necessários para conferir características únicas de sabor, aroma e coloração ao produto (CANHOS; DIAS, 1985).

b1) Sal (NaCl)

O sal é o principal agente de cura. Atua como conservante pela diminuição da atividade de água do produto, desidratação das bactérias e ação tóxica do íon cloro, sendo também agente flavorizante (valores iniciais de 2,5% a 3%), contribuindo para o sabor típico do produto curado. O sal é um dos primeiros obstáculos ao crescimento de microrganismos indesejáveis no salame, atuando também na solubilização e difusão das proteínas miofibrilares da carne formando um gel entre as partículas de carne e entre a carne e a gordura (CANHOS; DIAS, 1985; GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000; TYÖPPÖNEN et al., 2003).

A quantidade de sal adicionada ao salame é variável, oscilando entre 2% a 3%. Nos últimos anos, verifica-se a tendência da diminuição do teor de sal adicionado, pois o gosto muito salgado não é aceito pelos consumidores para esse tipo de produto (MONFORT, 2002).

Usualmente, os valores de cloreto de sódio adicionados à massa do salame estão situados entre 2,4% a 3%, o que possibilita obter valores de atividade de água inicial entre 0,96 a 0,97. Esses valores de atividade de água favorecem o crescimento das bactérias lácticas e dos micrococos que irão contribuir para a fermentação do produto (BERAQUET, 2005).

Os traços de metais presentes no sal podem diminuir a velocidade de sua solubilização e acelerar o processo de oxidação das gorduras. Em concentração mínima de 4,5%, o cloreto

de sódio exerce ação bacteriostática nos produtos curados, onde os íons de sódio também atuam como participantes do processo inibitório (CICHOSKI; TERRA; FREITAS, 2004).

A quantidade de cloreto de sódio e água são iguais em ambos os lados da membrana celular microbiana. A água passa através das membranas celulares em ambas as direções. Em solução salina de 5%, a concentração de água no interior da célula microbiana é maior que a existente no espaço extracelular, dessa forma ocorre difusão da água intracelular para o exterior da célula, levando ao processo de plasmólise, pelo qual a célula microbiana tem seu crescimento inibido e possivelmente morre (CICHOSKI; TERRA; FREITAS, 2004; TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

b2) Nitrato e nitrito

Há milhares de anos, a população humana consome carne salgada, tendo-se observado, nos tempos romanos, que além da ação conservante do sal, o produto final apresentava coloração avermelhada. Acredita-se que a utilidade dos nitratos tenha sido descoberta como resultado de sua presença como impureza no sal empregado nas carnes (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

Ingredientes obrigatórios no processo de cura do salame, os nitratos e/ou nitritos adicionados à matéria-prima objetivam além da formação de coloração avermelhada, mediante uma cadeia de reações com a mioglobina da carne, a inibição do crescimento de microrganismos patogênicos principalmente *Clostridium botulinum*, a proteção contra oxidação lipídica e a formação de sabor e aroma típico (CANHOS; DIAS, 1985; TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Em estudos relatados por PRICE; SCHWEIGERT (1994), a atividade antimicrobiana do nitrito sobre o *Clostridium botulinum* ocorre não pela inibição do processo de conversão de esporo em célula vegetativa (que sintetiza a toxina botulínica), mas sim pela inibição da divisão posterior das células vegetativas para formar colônias. Para a geração de cor, a adição de 10 a 50 ppm de nitrito é suficiente, porém para inibição de microrganismos indesejáveis necessita-se de 150 a 200 ppm. O uso de quantidade mínima de 125 ppm de nitrito é recomendado para o efetivo controle de *Salmonella* no salame (MONFORT, 2002).

No Japão, os embutidos cárneos fermentados devem conter teor mínimo de 200 ppm de nitrito de sódio e 3,3% de cloreto de sódio, para garantir sua segurança microbiológica e

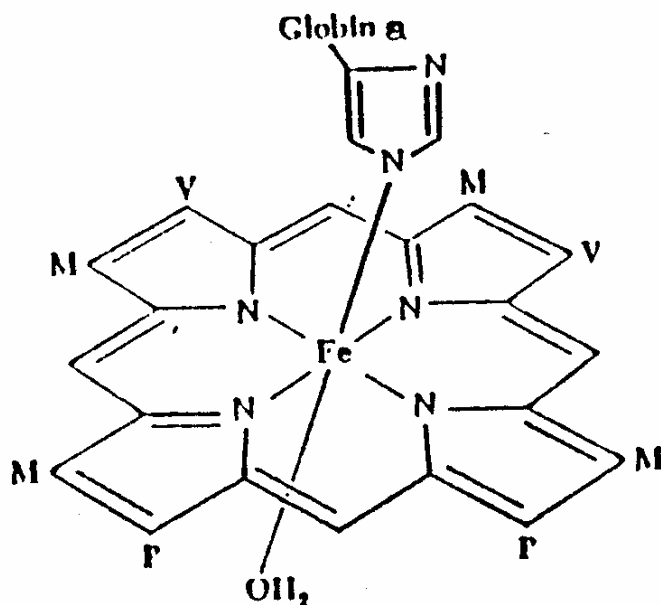
estabilidade durante o período de armazenamento (SAMESHIMA et al., 1998; ARIHARA; ITOH, 2000).

O nitrato não possui atividade antioxidante, mas torna-se funcional quando da sua redução para nitrito, atuando como reservatório de nitrito (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

O nitrato é utilizado na manufatura de embutidos fermentados com longo tempo de maturação, em níveis de 200 a 600 mg/ kg, embora esta última quantidade seja considerada excessiva. Quando se utiliza o nitrato, é desejável também o uso de culturas *starter* que reduzam o nitrato a nitrito para assegurar quantidade suficiente de nitrito ao longo de todo o período de maturação do produto (BERAQUET, 2005).

O efeito antioxidante do nitrito, mesmo em presença do sal (NaCl), conhecido pró-oxidante, deve-se à reação do nitrito ao grupamento heme da mioglobina que contém ferro (Figura 1). O íon ferro na forma oxidada (Fe^{+3}) catalisa reações de oxidação, porém o uso de nitrito mantém o íon ferro da mioglobina em sua forma reduzida (Fe^{+2}), que não atua como catalisador (PRÄNDL et al., 1994; LEMOS, 2005).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO COMPLEXO HEME DA MIOGLOBINA

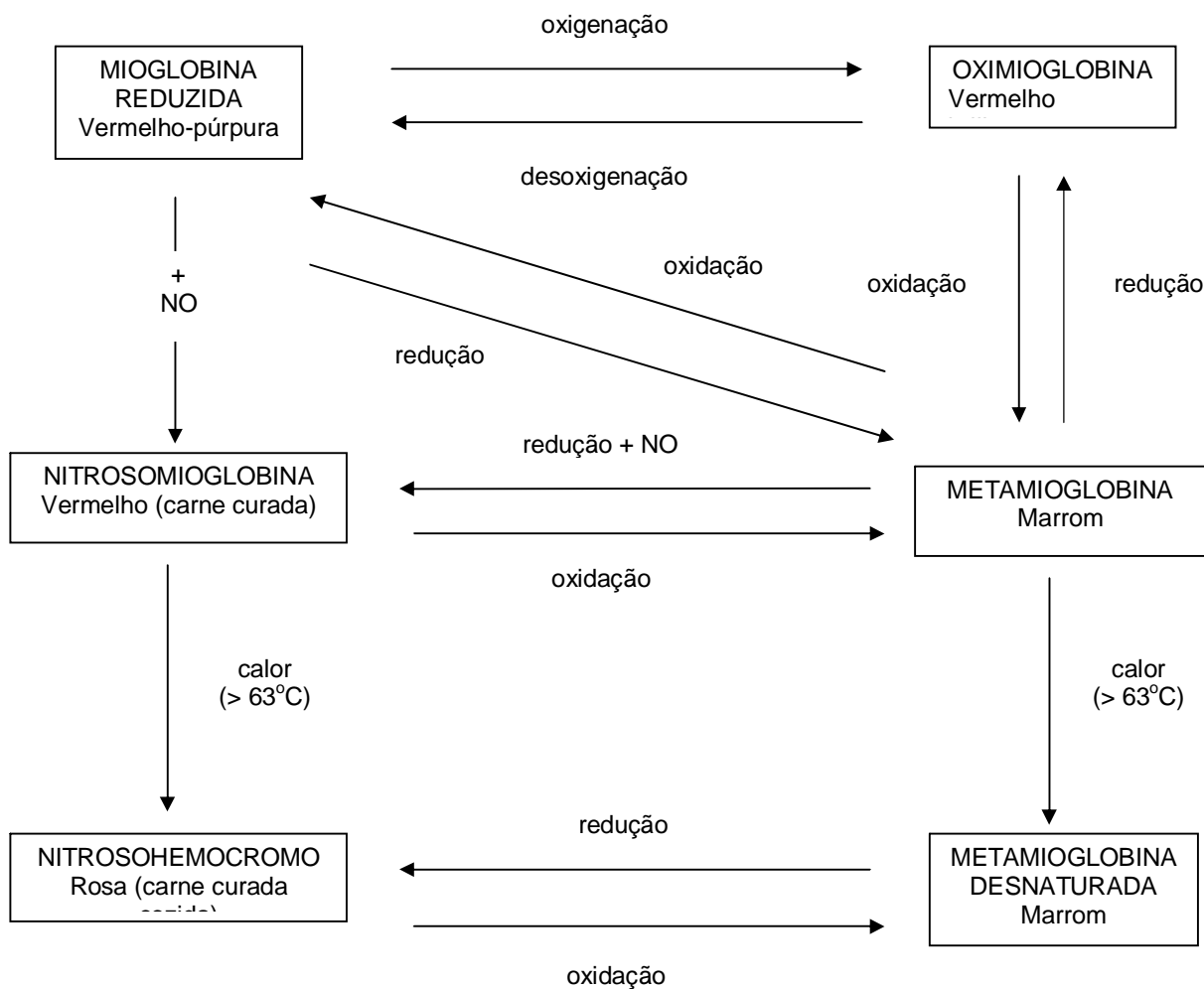


FONTE: SILVA, 1997.

O nitrito funciona como um quelante de metal, podendo formar compostos nitrosos que possuam atividades antioxidantes, além de converter proteínas heme em óxido nítrico estável (TERRA; FRIES; TERRA, 2004). A ação antioxidante do nitrito também pode estar relacionada ao seu efeito estabilizante sobre os lipídeos da membrana das células musculares (KRÖCKEL, 1995).

A Figura 2 mostra o intercâmbio entre as formas da mioglobina, que é dependente de vários fatores como o estado químico do ferro dentro do anel heme, da temperatura do meio e da presença de compostos nitrosos.

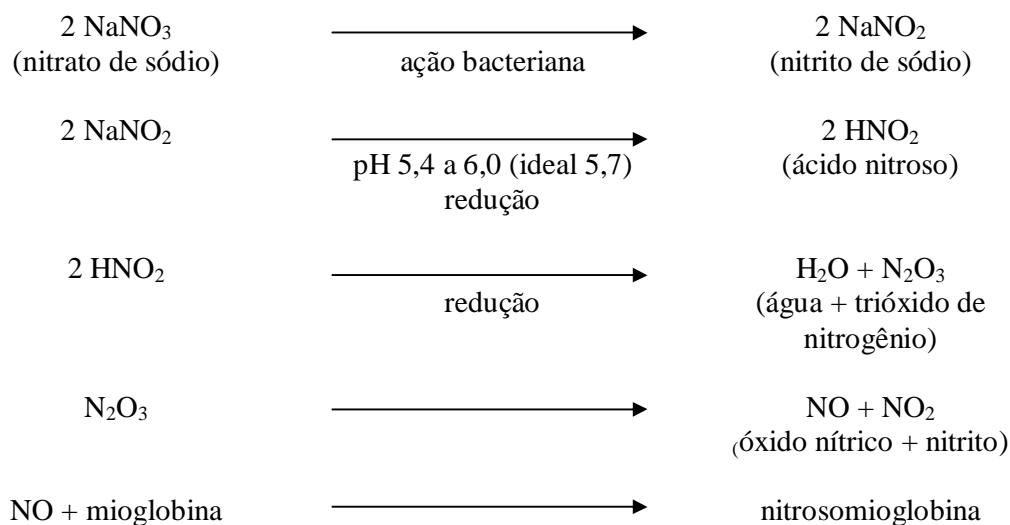
FIGURA 2 – FORMAS DA MIOGLOBINA EM CARNES FRESCAS, CURADAS E COZIDAS



FONTE: adaptado de TERRA; FRIES; TERRA, 2004.

Existem diferentes teorias sobre o desenvolvimento da reação de cor nas carnes curadas, sendo aceito dois modelos de reação, um que se caracteriza pela ação de enzimas da carne e outro que se baseia em reações puramente químicas (Figura 3). Na teoria das reações enzimáticas, há formação de nitrosometamioglobina a partir da ação do nitrito sobre substâncias da célula cárnea, originando no final do processo o pigmento nitrosomioglobina (PRÄNDL et al., 1994).

FIGURA 3 - REAÇÃO DE COR EM CARNES CURADAS



FONTE: TERRA, 1998.

Na reação de formação de cor, a redução de nitrato a nitrito ocorre por ação da enzima nitrato redutase produzida pelas bactérias dos gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*, pertencentes à família *Micrococcaceae*, cuja velocidade de redução depende de uma série de fatores do meio. Em pH acima de 6,2, a velocidade da reação é lenta, enquanto que em pH abaixo de 5,6, o processo é acelerado. A nitrato redutase é uma enzima intracelular formada na membrana citoplasmática das bactérias, que promove a redução do nitrato em baixas concentrações de oxigênio ou em condições anaeróbias, onde o nitrato é utilizado como aceptor de elétrons e dessa forma os microrganismos podem obter energia para seu desenvolvimento (JESSEN, 1995).

Em produtos cárneos obtidos por salga e desidratação, é importante a ação protetora do nitrito no início do processo, uma vez que os demais fatores inibitórios ao

desenvolvimento microbiano indesejável não estão plenamente estabelecidos (CANHOS; DIAS, 1985; CICHOSKI; TERRA; FREITAS, 2004).

O nitrito possui pK de 3,29 e por consequência, em baixos valores de pH, existe como ácido nitroso não dissociado. O estado máximo não dissociado e a atividade antibacteriana máxima do ácido nitroso encontram-se em valores de pH compreendidos entre 4,5 a 5,5. A redução de pH do meio para a conversão de nitrito em ácido nitroso pode ser obtida mediante a adição de bactérias lácticas à massa do produto cárneo, que ao fermentar carboidratos presentes no meio produzem ácidos orgânicos que abaixam o pH (JAY, 1994).

A resistência das bactérias lácticas, frente à inibição pelo nitrito, ocorre pela carência de ferredoxina, enzima de ferro enxofre, não heme, responsável pela conversão do piruvato em ATP, essencial para o metabolismo de algumas bactérias como *Clostridium* (JAY, 1994). O ácido nitroso é reduzido a óxido nítrico, o qual ao ocupar a sexta posição da ligação com o átomo de ferro do anel heme da mioglobina converte o pigmento da carne em mioglobina nitrosa ou nitrosomioglobina, de coloração vermelho escura, típica dos produtos cárneos curados crus. A mioglobina nitrosa também é efetiva na inibição da oxidação lipídica catalisada por íons ferro, cobre e cobalto, funcionando ainda como um repressor de radicais livres e dificultando a reação em cadeia dos mesmos (SILVA, 1997; TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

Busca-se reduzir o tempo de cura dos produtos com a adição direta de nitrito, que reage rapidamente, possibilitando também melhor controle da coloração do produto e da quantidade de nitrito residual (CANHOS; DIAS, 1985). O uso abusivo de nitrito, além de escurecer o produto, poderá causar intoxicação ocasionando cianose. A “queima” pelo nitrito pode originar coloração esverdeada ou escurecida à carne e é causada pela combinação de níveis elevados de nitrito em pH reduzido (JAY, 1994; TERRA, 1998).

Uma grande quantidade de nitrito residual pode também originar a formação de nitrosaminas, substâncias cancerígenas, pela combinação com aminas secundárias presentes na carne, devido à intensificação da proteólise durante a maturação do embutido fermentado (CANHOS; DIAS, 1985). Nessa etapa é importante a ação da enzima nitrito redutase, produzida pelos microrganismos da família *Micrococcaceae* e por algumas linhagens de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus sakei*, diminuindo a possibilidade de formação das nitrosaminas, mediante a redução dos níveis de nitrito residual. A capacidade de *L. plantarum* em reduzir o nitrito residual está condicionada à presença de pigmentos heme, sendo portanto, heme dependente, enquanto que a capacidade nitrito redutase de *L. sakei* é heme

independente. A atividade da enzima nitrito redutase pode ser dependente ou independente da presença de pigmentos heme, abundantes na carne. O produto final resultante da atividade nitrito redutase heme dependente é a amônia e na atividade nitrito redutase heme independente obtém-se como produtos finais óxido nitroso e óxido nítrico. Este último contribui para a formação de cor nos produtos fermentados (JESSEN, 1995; PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

A eficácia da ação nitrito redutora da microbiota fica demonstrada pelo fato de não ser comum a presença de nitrosaminas em produtos cárneos fermentados.

Além disso, a formação de nitrosaminas é intensificada quando o produto é exposto a altas temperaturas antes do consumo, procedimento não realizado nos embutidos fermentados, os quais são consumidos sem prévio aquecimento (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

Para evitar a presença de altas concentrações de nitrito residual nos produtos cárneos alemães, os embutidos crus somente são comercializados após quatro semanas de maturação (PRÄNDL et al., 1994).

No processo de formação de cor na cura, quando adicionam-se quantidades suficientes de nitrito e o valor de pH é adequado, ocorre a transformação de aproximadamente 2/3 da mioglobina da carne em nitrosomioglobina. A adição de substâncias redutoras como ascorbatos pode aumentar a proporção de mioglobina participante da reação, ao mesmo tempo em que reduz a quantidade de nitrito necessária (PRÄNDL et al., 1994).

Somente 10% a 20% do nitrito adicionado à carne pode ser encontrado como nitrito residual no produto final. Uma grande parte do nitrito liga-se à proteína não heme, aproximadamente 5% a 15% são utilizados para a formação de nitrosomioglobina, de 1% a 10% são reconvertidos a nitrato, de 5% a 15% reagem com grupos sulfidrílicos e de 1% a 15% são encontrados na fração lipídica e 1% a 5% na forma gasosa (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

A segurança microbiológica dos salames está baseada principalmente na ação do sal e do nitrito. O sal diminui a atividade de água inicial, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis e favorecendo o desenvolvimento das culturas *starter*. O nitrito na forma de ácido nitroso (HNO_2) não dissociada é capaz de atravessar a barreira da parede celular bacteriana e causar distúrbios na atividade enzimática e crescimento das bactérias indesejáveis (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

b3) Ascorbato

O ascorbato ou ácido ascórbico atua acelerando a redução de nitrito a óxido nítrico (NO) e auxilia a transformação do pigmento metamioglobina (marrom) em oximioglobina (vermelho brilhante) na carne (LEMOS, 2005).

PRÄNDL et al. (1994) citam experimentos realizados com carne e nitrito nos quais verificou-se que o uso de GDL (gluconato-delta-lactona) poderia intensificar a formação de nitrosaminas pela acidificação.

Contudo, a presença de ascorbato ou eritorbato sódico prevenia a formação das aminas. Além disso, a adição de GDL juntamente com um agente redutor à carne (ascorbato) diminui o tempo de processamento e permite a formação de cor adequada ao produto. A ação do ascorbato consiste em aumentar a atividade inibidora do nitrito por sequestrar o ferro (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

As nitrosaminas são formadas a partir da reação do nitrito com aminas secundárias somente quando o valor de pH é baixo (ótimo 3,0). Por isso, sua presença em produtos cárneos é menos freqüente do que em outros alimentos, principalmente vegetais folhosos. Apesar do pH da carne ser desfavorável à formação de nitrosaminas, sua presença foi comprovada em alguns derivados cárneos, provavelmente devido à ação do suco gástrico que contribui para sua formação. Por esta razão, o uso de ácido ascórbico ou ascorbato é indispensável em produtos curados visando reduzir a quantidade de nitrito residual.

b4) Gluconato-delta-lactona (GDL)

O gluconato-delta-lactona consiste de um pó branco de sabor levemente adocicado e de fácil dissolução em água. Seu uso baseia-se no fato de que em solução aquosa ou meios que contenham água, sofre hidrólise originando ácido glucônico, o qual facilita o abaixamento de pH no produto (PRÄNDL et al., 1994). A hidrólise do GDL a ácido glucônico é um processo lento, sendo por isso muito utilizado no processamento de derivados emulsionados, nos quais a acidificação somente deverá ocorrer após o embutimento da massa.

b5) Açúcares

Os açúcares são utilizados em quase todos os produtos cárneos em pequenas quantidades com o objetivo de proporcionar melhor sabor, caracterizando-se como agentes

flavorizantes. Atuam mascarando o sabor amargo dos sais de cura (sal, nitrato e nitrito) (CANHOS; DIAS, 1985).

Nos embutidos fermentados, também servem como substrato para a produção de ácidos pelos microrganismos presentes na carne ou pelas culturas adicionadas.

O decréscimo de pH exerce influência decisiva sobre a consistência, coloração, aroma e conservação dos salames. Dessa forma, o uso de açúcares contribui para a obtenção de produtos com características sensoriais e estabilidade desejáveis (CANHOS; DIAS, 1985; PRÄNDL et al., 1994).

O teor de glicose da carne bovina e da carne suína *in natura* é da ordem de 4,5 e 7 $\mu\text{mol/g}$, respectivamente, e seu uso como substrato para a produção de ácido láctico no salame não seria suficiente para gerar uma redução significativa do pH no embutido. Dessa forma, a acidez dos embutidos cárneos fermentados deve ser obtida com a adição de carboidratos fermentescíveis à massa dos produtos (BERAQUET, 2005).

A influência dos açúcares sobre a coloração do produto final está na acidificação gerada, que proporciona melhor redução de nitrito a óxido nítrico, cuja reação é favorecida em pH ótimo (5,4 e 5,5) originando finalmente o pigmento nitrosomioglobina de coloração vermelho escura. Além disso, as condições redutoras criadas pelo uso de açúcares redutores no embutido influenciam a cor do produto curado, pois estabilizam o ferro da mioglobina em sua forma ferrosa (PRÄNDL et al., 1994).

Nos salames utiliza-se entre os monossacarídeos, a glicose e a frutose e entre os dissacarídeos a sacarose, maltose e lactose, assim como hidrolisados de amido. De maneira geral, prefere-se os açúcares de baixo peso molecular que são melhor e mais rapidamente metabolizados pelos microrganismos, porém cada tipo de cultura utiliza diferentemente os açúcares. Enquanto a glicose pode ser aproveitada por todos os lactobacilos, a sacarose é fermentada por cerca de 80% das cepas e a maltose por 29%. No entanto, a lactose não é desdobrada pela maioria da flora dos embutidos crus, porém o uso de açúcares menos fermentescíveis permite obter embutido com sabor final ligeiramente mais doce e menos ácido (PRÄNDL et al., 1994; MONFORT, 2002).

As bactérias lácticas utilizadas como *starter* na elaboração de produtos cárneos fermentados produzem ácido láctico a partir da glicose e da lactose como seu único metabólito. O uso de lactose é indicado somente quando a cultura *starter* possui a capacidade de fermentá-la, pois muitas bactérias lácticas não o fazem facilmente. A partir de pentoses

como arabinose e xilose, as bactérias lácticas produzem ácido láctico e ácido acético, geralmente na proporção de 10:1, respectivamente (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

O teor de carboidratos adicionado à formulação dos embutidos fermentados é um importante fator para a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas da cultura *starter*. SAMESHIMA et al. (1998) recomendam a adição de no mínimo de 0,75% de glicose na formulação do produto para garantir o crescimento adequado para cultura láctica e sua ação protetora no salame.

Para a elaboração de embutidos de maturação rápida, considera-se suficiente o uso de 0,5% a 0,7% de açúcares, podendo ser glicose quando se deseja intensa queda de pH no início da fermentação e de 0,2% a 0,3% para produtos de maturação lenta (PRÄNDL et al., 1994, TYÖPPÖNEN et al., 2003).

b6) Condimentos

Os condimentos mais utilizados são a pimenta branca e a pimenta preta e em menor quantidade a noz moscada e o alho. Nos últimos anos, visando melhorar o sabor e o aroma dos embutidos de fermentação rápida, também são utilizados alguns preparados aromáticos que conferem a esses produtos sabor de fundo equilibrado com notas curadas, os quais se assemelham ao sabor e ao aroma dos embutidos fermentados tradicionais (MONFORT, 2002).

Algumas especiarias como a pimenta vermelha, mostarda, noz moscada e pimenta preta estimulam a formação de ácido láctico pelas bactérias lácticas devido ao seu teor de manganês. O manganês é utilizado pela microbiota láctica para o processo de inúmeras reações enzimáticas na célula microbiana, incluindo a atividade da enzima frutose 1,6 difosfato aldolase que possui grande importância na glicólise bacteriana (BERAQUET, 2005).

Também podem ser utilizados condimentos e as ervas aromáticas que possuem ação antimicrobiana e antioxidante, como alecrim, orégano, sálvia, cravo-da-índia e pimenta da Jamaica. A significativa atividade antioxidante dessas especiarias é atribuída à presença de compostos fenólicos em sua composição (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

b7) Outros ingredientes

No sentido de obter maior padronização no aspecto dos embutidos curados fermentados, torna-se mais freqüente o uso de corantes e o uso de proteínas não cárneas, coração e emulsão de couro, visando reduzir os custos de produção. Desta forma, permite-se a comercialização de embutidos voltada para um mercado consumidor de menor poder aquisitivo, trazendo diversificação em sua dieta e oferecendo um produto com alto teor protéico, de fácil conservação no ambiente e de baixo custo (MONFORT, 2002).

c) Embutimento

O embutimento da massa de salame é realizado em tripas apropriadas que devem ser permeáveis à água, para permitir uma adequada evaporação da água e conseqüente secagem, e ser capazes de aderir à superfície da carne, de forma que não se desprenda conforme o produto seca e se contrai (BERAQUET, 2005).

Normalmente, a massa curada é mantida em câmara fria por 12 a 48 horas previamente ao embutimento para proporcionar melhor formação de cor pela reação dos sais de cura sobre o pigmento da carne (PRICE; SCHWEIGERT, 1994; PARDI et al., 1996).

d) Maturação ou fermentação

A maturação ou fermentação consiste em manter o produto durante um período de tempo sob condições controladas de temperatura e umidade relativa do ar. Nessa etapa ocorrem o desenvolvimento do aroma, modificações na textura, dessecação, endurecimento do produto e finalizam-se as reações de cura (FORREST et al., 1979).

Os processos bioquímicos, microbiológicos e físicos que ocorrem durante a maturação trazem, em conseqüência, fenômenos de cor, desdobramento e transformação das proteínas, das gorduras e hidratos de carbono. Os produtos de degradação são os principais responsáveis pelo odor e sabor característicos dos embutidos crus maturados.

A fermentação é considerada, por muitos autores, a etapa mais importante do processamento do salame. Durante essa fase, ocorre a produção de ácido láctico e, conseqüentemente, o abaixamento do pH do embutido, que contribui diretamente sobre o sabor levemente picante, a textura típica e a conservação do produto final (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

O processo de maturação poderá ser realizado de forma rápida ou lenta. No processo rápido com o uso de nitrito somente, a cura da carne ocorre exclusivamente por reações químicas, nas quais o ácido ascórbico e o glucona-delta-lactona atuam como acidificantes. Essa acidificação deve permitir atingir níveis de pH de 5,0 a 5,3, coincidente com o ponto isoelétrico das proteínas da carne, no qual ocorre a liberação mais rápida da água do produto.

No processo lento, utilizado nos salames, a ativação acontece por conta de microrganismos *starters* ou iniciadores que promovem a redução de nitrato em nitrito. O ponto ótimo para essa reação está em pH 5,6 a 6,0, enquanto que em pH abaixo de 5,4, o processo começa a inativar-se. Ressalta-se que essa etapa deve ser realizada em ambiente com temperatura entre 16 e 18° C, sendo inconveniente temperaturas mais altas para manter a integridade das gorduras. Embora no processo lento, o tempo necessário para a obtenção do produto seja maior, há formação de sabor e aroma desejáveis produzidos pelos microrganismos adicionados (PARDI et al., 1996).

Na maturação ou fermentação dos salames ocorre o crescimento da flora bacteriana que fermenta o açúcar, produzindo ácido lático e promovendo o abaixamento do pH das proteínas da carne até seu ponto isoelétrico, tornando-as menos capazes de se unir à água. Esse fenômeno auxilia a perda de água durante a secagem do produto (PRICE; SCHWEIGERT, 1994). A acidificação gerada contribui para a liga e o aumento da consistência do produto, permitindo uma estrutura sólida propícia ao fatiamento, além de contribuir na formação do odor e sabor típicos do salame (CORETTI, 1971).

Inicialmente, a fermentação dos salames ocorria como resultado da ação dos microrganismos resultantes das contaminações sobre os açúcares da formulação utilizada no preparo do produto, com conseqüente produção de ácido lático. Porém, a qualidade dos salames não era uniforme, pois dependia do tipo de flora contaminante. A partir de 1961, o uso de cultura puras selecionadas tornou-se difundido, possibilitando a obtenção de salames de alta qualidade reproduzível nas diferentes partidas de fabricação (TERRA, 1998).

No passado, os produtores de salame verificaram que a inoculação da matéria-prima com porções de carne já fermentada melhorava a consistência e a estabilidade dos produtos. Esse procedimento, no entanto, não permitia estimar o número, a viabilidade e o tipo de microrganismo utilizado. A solução foi cultivar os microrganismos desejáveis separadamente para depois adicioná-los ao produto, mantendo assim as propriedades da cultura estáveis. Essas linhagens purificadas de microrganismos, disponíveis comercialmente, são

denominadas culturas *starter* ou cultivos iniciadores (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

Culturas *starter* são definidas como preparações que contêm microrganismos vivos capazes de desenvolverem atividade metabólica desejável na carne (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

O tipo de cultura *starter* utilizada na fabricação de salames varia de acordo com o agente de cura empregado. Quando se utiliza nitrito como único agente de cura, normalmente recomenda-se o emprego de bactérias lácticas e estafilococos, enquanto que a adição de nitrato para a cura necessita da ação de bactérias nitrato-redutoras do gênero *Micrococcus* como integrantes da cultura *starter* (HUGAS; MONFORT, 1997).

Os microrganismos da cultura *starter* devem apresentar como características o crescimento vigoroso em concentrações de 6% de cloreto de sódio e de 100 mg/ kg de nitrito, crescimento na faixa de temperatura de 20 a 43° C e não possuir atividade patogênica ou produzir substâncias tóxicas (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

A Tabela 4 mostra os microrganismos mais comumente utilizados como culturas *starter* para a fermentação do salame.

TABELA 4 - COMPONENTES DAS CULTURAS *STARTER* PARA A FERMENTAÇÃO CÁRNEA

MICRORGANISMOS	GÊNEROS E ESPÉCIES
Bactérias ácido-lácticas	<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus sakei</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus varians</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces griseus</i>
Leveduras	<i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Cândida famata</i>
Mofos	<i>Penicilium nalgiovense</i> <i>Penicillium crysogenum</i>

FONTE: TERRA, 1998.

A adição de microrganismos desejáveis na carne pode ser realizada com os objetivos de aumentar a segurança microbiológica do produto, manter a estabilidade mediante a

inibição do crescimento de indesejáveis, além de melhorar as características sensoriais e promover efeitos benéficos à saúde (LÜCKE, 2000).

O processo de fermentação da carne acarreta uma série de benefícios em sua conservação, sendo que a principal razão para o uso de bactérias lácticas nesse processo está em sua habilidade em gerar acidificação intensa e controlada que inibe o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

Nas carnes fermentadas, as bactérias lácticas têm sido utilizadas desde os anos 50, sendo empregadas com a finalidade de proporcionar segurança, aumentar a estabilidade e inibir microrganismos indesejáveis, enquanto que bactérias do tipo cocos catalase positivas, como dos gêneros *Staphylococcus* e *Kocuria*, leveduras do gênero *Debaryomyces* e bolores (*Penicillium*), normalmente proporcionam características sensoriais desejáveis ao produto. As bactérias lácticas reduzem o pH do produto para valores próximos a 5,0 nos primeiros dias de fermentação, tornando o ambiente protegido contra a ação de grande número de bactérias gram negativas indesejáveis (LÜCKE, 2000; TYÖPPÖNEN et al., 2003). O baixo pH dos embutidos fermentados é a base para sua segurança microbiológica e também favorece a obtenção de textura e coloração desejadas (ERKKILÄ et al., 2001b).

Durante os primeiros dias de fermentação do salame, os microrganismos presentes na massa cárnea consomem o oxigênio incorporado durante a mistura da massa, reduzindo o potencial de óxido-redução (Eh 100 a 200 mV), tornando a ação do nitrito mais efetiva e restringindo o crescimento de bactérias aeróbias deterioradoras (*Pseudomonas*). Após esse período, o crescimento das bactérias lácticas proporciona teores de ácido láctico suficientes para provocar a queda do pH. O baixo pH interfere na homeostasia de diferentes bactérias patogênicas como *Salmonella* e *Clostridium* e de bactérias deterioradoras como pseudomonas e enterococos. Em uma solução, as formas dissociada e não dissociada dos ácidos fracos são dependentes do pH do meio (pK do ácido láctico 3,86). Baixos valores de pH favorecem a forma não dissociada do ácido láctico, a qual é capaz de atravessar a membrana celular microbiana. Dessa forma, quanto menor o pH do meio maior é o efeito inibitório sobre os microrganismos. No entanto, nos valores de pH da maioria dos salames (pH 4,8), somente 10% do ácido láctico encontra-se sob a forma não dissociada, resultando em moderado efeito inibitório (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

As enzimas endógenas da carne e os compostos redutores adicionados à massa, como os ascorbatos, também contribuem para a diminuição do potencial de óxido-redução do embutido no início da maturação. Isso favorece o desenvolvimento dos microrganismos

microaerófilos como as bactérias lácticas, que também são beneficiadas em seu crescimento pela adição do cloreto de sódio, o qual diminui a competição microbiana por nutrientes ao inibir a microbiota indesejável (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

A microbiota gram negativa, principal responsável pela deterioração da carne utilizada para o processamento do salame, é afetada primeiramente pelo sal, que diminui a atividade de água e pelo nitrito, que inibe o crescimento das bactérias patogênicas como a *Salmonella*.

O consumo de oxigênio após o embutimento torna o ambiente microaerófilo e anaeróbio, cujas condições favorecem o crescimento das bactérias lácticas que são capazes de produzir substâncias conservadoras na carne, sendo de grande importância sua adição à massa do salame, visando evitar a flora contaminante natural da carne. Durante a fermentação e a maturação do salame, alguns fatores de conservação perdem a importância ao longo do processo. Inicialmente, os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias lácticas diminuem o pH da massa e ao mesmo tempo em que o nitrito é reduzido gradativamente, o potencial redox aumenta, ocasionando perda da viabilidade das bactérias lácticas e podendo levar a um aumento do pH. O único fator que assume grande importância ao longo do processo é a atividade de água, que inibe os processos de deterioração do produto, constituindo-se como o fator de conservação mais importante na maioria dos embutidos crus curados (MONFORT, 2002). Produtos cárneos com atividade de água inferior a 0,86 apresentam como microflora típica bactérias lácticas, bactérias micrococáceas, leveduras, bolores e ausência de *Clostridium* e bactérias gram negativas (CICHOSKI; TERRA; FREITAS, 2004). O obstáculo de maior efeito sobre o crescimento microbiano nos salames é a reduzida atividade de água. A queda do pH proporciona redução na capacidade de retenção de água da carne, facilitando a secagem do produto e gerando valores de atividade de água abaixo de 0,90 no produto final (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Segundo HUGAS; MONFORT (1997), no isolamento de 254 cepas de *Lactobacillus* de 15 diferentes salames espanhóis fermentados espontaneamente, sem a adição de cultura *starter*, verificou-se que a espécie *L. sakei* apresentava-se como a mais freqüente nos produtos (55%), seguida pelo *L. curvatus* (26%), *L. bavaricus* (11%) e *L. plantarum* (8%). As bactérias lácticas mais utilizadas comercialmente como integrantes da cultura *starter* são *Lactobacillus casei*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

HAMMES; HERTEL (1998) descrevem as espécies de microrganismos comumente utilizadas em produtos cárneos fermentados (Tabela 5).

TABELA 5 - MICRORGANISMOS COMUMENTE EMPREGADOS EM PRODUTOS CÁRNEOS FERMENTADOS

MICRORGANISMOS	GÊNEROS E ESPÉCIES
Bactérias lácticas	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ^a , <i>L. alimentarius</i> ^b , <i>L. casei</i> ^a , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. sakei</i>
	<i>Lactococcus lactis</i>
	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Actinobacteria	<i>Kocuria varians</i> ^c
	<i>Streptomyces griseus</i>
	<i>Bifidobacterium sp.</i> ^a
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. xylosus</i> , <i>S. carnosus subsp. carnosus</i> , <i>S. carnosus subsp. utilis</i> , <i>S. equorum</i> ^b
Halomonadaceae	<i>Halomonas elongata</i> ^b (testada em presunto cru curado)
Enterobactérias	<i>Aeromonas sp.</i>
Bolores	<i>Penicillium nalgiovense</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. camemberti</i>
Leveduras	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida famata</i>

FONTE: HAMMES; HERTEL, 1998.

^a Utilizados como culturas probióticas

^b Utilizados em testes comerciais em escala industrial (Laboratorium Wiesby, Niebüll and Rudolf Müller and Co)

^c Anteriormente denominado *Micrococcus varians*.

A adição de bactérias lácticas e microrganismos da família *Micrococcaceae* como *starter* em produtos cárneos fermentados aumenta sua segurança e a estabilidade, proporcionando maior período de vida útil e diversidade de características sensoriais, assim como efeitos benéficos à saúde quando utiliza-se microrganismos probióticos (PAPAMANOLI et al., 2003).

De acordo com TERRA (1998), o uso de lactobacilos e pediococos além de promover a inibição de indesejáveis pela acidificação do produto contribui para a coloração, desidratação e formação de sabor ácido típico. Os micrococos e estafilococos atuam na coloração, sabor e aroma. Estes últimos obtidos pela ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas que geram peptídeos, aminoácidos e ácidos graxos. Na coloração reduzem o nitrato a nitrito, aumentando a disponibilidade de óxido nítrico para reagir com a mioglobina e por possuírem atividade catalase-positiva destroem o peróxido de hidrogênio que quando acumulado na carne provoca o aparecimento de coloração esverdeada altamente indesejável. Os microrganismos da família *Micrococcaceae* também consomem oxigênio, evitando a rancificação prematura das gorduras (PARDI et al., 1996; PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

Alguns gêneros de leveduras são usados como culturas protetoras, pois dificultam o desenvolvimento de bolores toxigênicos quando inoculadas na superfície dos produtos (LÜCKE, 2000). A aplicação superficial de mofos como o *Penicillium nalgiovense* e leveduras como *Debaromyces hansenii* nos salames colabora na formação do aroma pela liberação de compostos voláteis oriundos a partir da ação das enzimas desaminases, transaminases e desidrogenases sobre as matérias-primas. Além disso, a deposição externa tanto do mofo como da levedura regula não somente a entrada do ar como da luz, potentes catalisadores da rancificação do toucinho adicionado à formulação do embutido (TERRA, 2003).

Alguns salames, particularmente aqueles produzidos na França, Espanha e Itália, apresentam em sua superfície o desenvolvimento de bolores e leveduras que proporcionam propriedades sensoriais desejáveis ao produto. Devido à elevação do pH superficial, gerado pela presença dos fungos, é importante que sua atividade ocorra somente quando o pH e o teor de água estiverem baixos o suficiente para prevenir bactérias indesejáveis, como as listérias. Os *starter* de superfície protegem o produto contra oxidação, pois dificultam a entrada de oxigênio na peça, facilitam a secagem, servindo como tampão nas flutuações do teor de umidade dentro da câmara e desenvolvem modificações desejáveis na aparência e sabor do produto. Dentre as espécies de fungos utilizadas, destaca-se o *Penicillium nalgiovense*, muitas vezes empregado em conjunto com a levedura *Debaryomyces hansenii* (LÜCKE, 2000). Desse modo, as leveduras desempenham ação redutora do sabor ácido no salame por metabolizarem o ácido láctico e tornarem o aroma mais intenso devido a suas propriedades proteolíticas e lipolíticas (TERRA, 1998).

No Brasil, não é comum o uso de *starter* de superfície, pois a presença de bolores superficiais no salame é pouco apreciada. Nesse caso, recomenda-se a aplicação de óleo comestível na superfície externa dos envoltórios ou previamente ao embutimento sua imersão em solução de sorbato de potássio a 2,5% (PARDI et al., 1996).

No uso de culturas *starter* deve-se observar a quantidade de células viáveis a ser adicionada à massa cárnea, haja vista que o número desses microrganismos deve superar em dois ciclos logarítmicos o número de contaminantes das carnes usadas como matérias-primas. Como o número máximo de microrganismos mesófilos aeróbios aceitáveis na carne refrigerada é de 10^6 UFC/ g, normalmente utiliza-se 10^8 UFC de microrganismos *starter*/ g de carne (TERRA, 1998).

Na fermentação de produtos cárneos por bactérias lácticas indica-se o uso das culturas homofermentativas, que produzem unicamente ácido láctico, pois os microrganismos heterofermentativos podem produzir etanol e gás carbônico, além de outros ácidos, como o ácido acético, indesejáveis em carnes face às modificações que podem ocasionar nas características sensoriais do produto. No isolamento de bactérias lácticas de 38 amostras de embutidos cárneos curados artesanais, BROD; SAWITZKI; FIORENTINI (2002) obtiveram 186 cepas, entre as quais 87,6% caracterizavam-se como homofermentativas, demonstrando maior incidência dessa microbiota em produtos com fermentação natural.

Para o adequado processo de fermentação dos salames deve-se controlar a temperatura e a umidade relativa do ar nas câmaras de fermentação. PRICE; SCHWEIGERT (1994) recomendam temperaturas entre 24 a 43° C e umidade relativa de 85% a 95 % até que o pH do produto alcance o valor desejado, normalmente em torno de 5,0, para salames de baixo pH. Por sua vez, CORETTI (1971) indica temperaturas entre 18 a 20° C para a fermentação de salames com pH moderado, acima de 5,0.

O salame pode sofrer defumação antes ou após a maturação. A defumação deve ser realizada a frio com temperatura máxima de 30° C a umidade relativa de 75% a 80 %. Este processo não é comumente utilizado no Brasil e nem em alguns países da Europa como França, Suíça, Itália e Sudeste Europeu (PARDI et al., 1996).

Na Europa, os embutidos fermentados de baixo pH são elaborados mediante a adição de culturas iniciadoras e açúcares fermentescíveis. Esse tipo de produto sofre fermentação em temperaturas de 18 a 24° C até obtenção de pH entre 4,6 a 5,2. Nos embutidos em que se deseja recobrimento com mofo, efetua-se a inoculação superficial de *Penicilium* ssp., enquanto que nos embutidos não recobertos por mofo aplica-se banho com solução de pimaricina ou sorbato de potássio. A defumação é realizada após a etapa de fermentação e os processos de secagem ocorrem em temperaturas de 12 a 16° C. Entre os produtos europeus de baixo pH estão a maioria dos salames da região centro-norte da Europa, os salsichões e *chorizos*. Em alguns salames efetua-se o cozimento após a fermentação com o intuito de melhorar a estabilidade do produto, aumentar a consistência e reduzir a perda de peso (MONFORT, 2002). Nesses embutidos, o ácido láctico é o principal componente responsável pelo aroma, embora o ácido acético também esteja presente e contribua, em pequenas concentrações, para a formação das características de palatabilidade do produto. O fator determinante para o término da maturação desses salames é o pH final do produto (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

O teor de aminoácidos e ácidos graxos livres aumenta durante o processo de maturação, podendo afetar o sabor e o aroma final do embutido. O uso de diferentes tipos de culturas *starter* com espécies variadas de microrganismos afeta o aroma e o sabor do produto final, por isso, quando novas culturas são selecionadas, sua habilidade em contribuir para a obtenção de características sensoriais desejadas deve ser verificada (ERKKILÄ et al., 2001b).

Os embutidos com pH moderado ou elevado são tradicionais do sul da Europa, principalmente da Espanha, França e Itália, onde o sabor pouco ácido dos produtos é muito apreciado. Para evitar a acidificação intensa, a adição de açúcares à massa do produto é controlada, embora muitas vezes o uso de açúcares seja dispensado. A temperatura de fermentação é mantida em 16° C, sendo utilizadas tripas de pequeno calibre e a adição de substâncias inibidoras do crescimento microbiano como lactato de sódio para diminuir a velocidade de acidificação. Os produtos que possuem essas características são os salames italianos, o salsichão de Vic, os embutidos de pequeno calibre (*secallona*, *espetec*), alguns chorizos maturados a frio, a *sobrassada* (típica da Ilha de Mallorca) e a *butifarra* doce (típica da Província de Gerona na Espanha) (MONFORT, 2002).

e) Secagem

O processo de secagem dos salames inicia-se durante a fermentação pela redução do pH da carne para valores inferiores a 5,3, ocorrendo a coagulação das proteínas miofibrilares com conseqüente liberação de água. Um dos fatores que influenciam na difusão da água do interior para a superfície do produto é o pH, sendo que em pH acima de 6,2 a difusão é reduzida (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001; CICHOSKI; TERRA; FREITAS, 2004).

Durante a secagem, os embutidos perdem de 30% a 40% de seu peso inicial, sendo importante que a perda de umidade seja gradual, a fim de evitar a formação de rugosidade, ressecamento excessivo da casca e desprendimento da tripa. A crosta ressecada no produto impede a saída de água de seu interior, tornando o embutido muito "macio" principalmente aqueles com maior calibre, podendo causar prejuízo à sua conservação (PRICE; SCHWEIGERT, 1994; GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

A temperatura das câmaras de secagem oscila entre 10 a 17° C com umidade relativa do ar de 65% a 85% (PRICE; SCHWEIGERT, 1994). PARDI et al. (1996) citam temperaturas de 12 a 15° C e umidade relativa de 70% para a dessecação do salame.

TERRA (1998) destaca os principais pontos críticos da fabricação de salames e recomenda algumas ações para a obtenção de um produto com qualidade sensorial e microbiológica (Quadro 1).

QUADRO 1 - BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO (BPF) E VALORES PARA O CONTROLE DE PONTOS CRÍTICOS NO PROCESSAMENTO DE SALAME

PONTOS CRÍTICOS	BPF E VALORES
Carga microbiana das carnes	Contagem de aeróbios mesófilos abaixo de 5×10^6 UFC/ g <i>Enterobacteriaceae</i> inferior a 10^5 UFC/g
Temperatura das carnes	Armazenamento próximo a 0° C, nunca acima de 7° C
pH das carnes	Inferior a 5,8
Aw das carnes	Inferior a 0,96
Adição de nitrito	Aproximadamente 125 ppm
Adição de nitrato	Aproximadamente 300 ppm
Adição de açúcar	Fermentação lenta: adição de glicose/ sacarose 0,3% Fermentação rápida: 0,5% a 0,7% (lactose pode ser substituta da glicose/sacarose em porcentagens de 0,5% e 1,0%, respectivamente).
Adição de glucona-delta-lactona	Fermentação rápida: adição de 0,3%
Adição de cultura <i>starter</i>	Mistura de <i>Lactobacillus</i> e <i>Micrococcus</i>
Temperatura de fermentação	Inferior a 22° C (25° C) no início da fermentação. Quando do uso de nitrato não superior a 18° C
Umidade relativa do ar	Início 90% com redução gradual para 75%
Velocidade do ar	Início 0,8 - 0,5m/s. Final redução para 0,5 - 0,2 m/s
Microflora interna do embutido	Início: vários gêneros Durante processo, predomínio de bactérias lácticas (lactobacilos, pediococos). Leveduras e micrococcos são desejáveis. Final: enterobactérias inferior a 104 UFC/ g
Microrganismos superficiais desejáveis	Mofos <i>Penicillium</i> Leveduras <i>Debaryomyces</i>
Microrganismos superficiais indesejáveis	Defumação leve previne desenvolvimento de mofos Imersão em solução de 15% a 20% de sorbato antes da armazenagem ou transporte
Valor de pH	Queda para 5,0 no 2° dia (processo rápido) ou 4 a 5 dias (processo normal). Temperaturas inferiores a 18° C geram menor acidificação
Aw do embutido	Fermentação rápida: inferior a 0,95 Fermentação lenta: inferior a 0,90 Para exportação aos EUA e Japão: igual ou inferior a 0,86

FONTE: TERRA, 1998.

2.1.1.3 Desenvolvimento da textura, sabor e aroma do salame

A formação da textura típica dos produtos cárneos fermentados inicia-se na etapa de maturação, quando o crescimento das bactérias lácticas é favorecido pela presença de carboidratos no produto, promovendo a fermentação e conseqüente produção de ácidos. A presença de ácidos promove o abaixamento do pH até valores próximos da faixa em que se situa o ponto isoeletrico da maioria das proteínas da carne (pH 5,3 a 5,5), condição em que a capacidade de ligação da água pelas proteínas é reduzida (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

As moléculas de água, em pH neutro, são carregadas eletricamente, contendo cargas positivas e negativas, as quais encontram-se ligadas com os grupos reativos das proteínas miofibrilares, das proteínas sarcoplasmáticas e do colágeno da carne. A diminuição do pH, atingindo o ponto isoeletrico das proteínas da carne, é responsável pela redução do número de grupos reativos disponíveis para a ligação da água com as proteínas, havendo igualdade entre o número de grupos reativos carregados positiva e negativamente, o que promove a repulsão entre as moléculas de água e proteínas (SILVA, 1997). Dessa forma, as moléculas protéicas aproximam-se uma das outras, havendo a formação de novas ligações que estabilizam a estrutura cárnea. Esse processo é caracterizado pelo encolhimento de produto e perda de água, sendo denominado sinérese. A influência dos ácidos produzidos promove uma agregação mais intensa e mais estável das proteínas, formando uma estrutura firme. Paralelamente, a diferença entre a atividade de água do produto e a umidade relativa da câmara de maturação faz com que haja perda de água por evaporação. Durante a fermentação e a secagem, devido à perda de água e à desnaturação protéica, ocorre substituição das ligações inicialmente instáveis por ligações de condensação estáveis e o sistema protéico viscoso inicial é transformado de seu estado “sol” em estado de “gel” coloidal. Essa estrutura é estabilizada por ligações ramificadas, proporcionando ao produto características de elasticidade e fatiabilidade (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

Estudos detalhados mostram que a miosina é a proteína solubilizada em maior quantidade pelo sal, tendo seus miofilamentos primeiramente intumescidos e progressivamente fragmentados em um processo halolítico que envolve o aumento da perda da banda estriada típica da miofibrila, dependendo da concentração de cloreto de sódio. Na periferia das miofibrilas, as proteínas intumescidas e parcialmente fragmentadas formam uma

rede adesiva, retentora de tecido muscular, tecido conectivo e partículas de gordura (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

O aroma típico dos embutidos fermentados é resultado da ação dos microrganismos sobre as matérias-primas, somada à ação das enzimas da própria carne sobre carboidratos, proteínas e lipídeos, que combinadas com os condimentos adicionados produzem as características sensoriais peculiares do produto (ERKKILÄ et al., 2001b).

As características de *flavor* tanto da carne *in natura* como dos produtos fermentados são resultantes da soma dos compostos voláteis e não voláteis provenientes da degradação microbiana e de reações químicas como a reação de Maillard, a degradação de Strecker, hidrólises e oxidações.

Lipídeos, proteínas e carboidratos funcionam como substratos dessas reações havendo a formação de aminoácidos, compostos aromáticos, nucleotídeos, aldeídos e ácidos graxos livres (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001). O termo *flavor* pode ser definido como a impressão total percebida através de sensores químicos do produto na boca. Dessa forma, o *flavor* inclui as sensações de sabor e aroma, além da sensação de adstringência, sensação metálica de sangue e sensação picante das pimentas. A textura, aparência e sons produzidos durante a mastigação dos alimentos têm influência sobre o *flavor*, porém não são comumente incluídos em sua definição (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

A proteólise nos salames está principalmente relacionada com a ação das enzimas das células musculares que geram aminoácidos livres, contribuindo para o sabor e aroma, e sofre pouca influência da ação da cultura *starter* (ZANARDI et al., 2004).

Longos períodos de maturação de salames e a atividade de outros microrganismos geram altas concentrações de compostos voláteis originados de lipídeos e compostos nitrogenados. Enzimas tissulares são os principais agentes da lipólise e proteólise em salames com ausência de bolor superficial. A enzima catepsina D é ativada em pH próximo de 5,0 e produz peptídeos metabolizados pela flora microbiana durante a maturação. Enzimas bacterianas promovem a degradação dos peptídeos formados, podendo desenvolver sabor e aroma de produto maturado em poucas semanas. Nesse sentido, estudos com a adição à massa do salame de proteinases isoladas da parede celular de *Lactobacillus paracasei* mostraram o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis no produto em duas semanas de maturação. Tal fato, pode ter ocorrido devido à estimulação da atividade microbiana pela adição da enzima (LÜCKE, 2000).

Estudos relatados por PINTO; PONSANO; HEINEMANN (2001) mostram que culturas de *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus* e *S. warneri* foram capazes de produzir compostos aromáticos mediante o catabolismo de aminoácidos como valina e leucina. Essas culturas também produziram etilbutirato com leve aroma de frutas dependendo das condições de pH e temperatura do meio.

A oxidação dos embutidos cárneos pode iniciar durante o processo de moagem da carne, a qual ao se desintegrar, libera ácidos graxos insaturados provenientes dos fosfolípídeos da membrana celular e íons ferro da mioglobina (TERRA; FRIES; KUBOTA, 2005).

A lipólise, que ocorre durante o processo de secagem e maturação dos produtos cárneos, consiste na liberação de ácidos graxos pela ação das enzimas lipolíticas produzidas por microrganismos e pela própria carne. Essa alteração influencia o sabor dos produtos cárneos e pode ser identificada durante o cozimento quando ocorre a liberação de compostos voláteis, sendo proporcional à quantidade de ácidos graxos livres presentes. A alteração hidrolítica que ocorre nos embutidos fermentados crus consiste principalmente na ruptura das ligações ésteres dos triglicerídeos por enzimas esterases, que caracterizam-se por agir em substratos insolúveis (mono, di e triglicerídeos). As esterases de origem microbiana ou endógenas do tecido adiposo agem com o auxílio de uma molécula de água, promovendo hidrólise da ligação éster e resultando em álcool e um ou mais ácidos carboxílicos (CICHOSKI; TERRA, 2001).

ZANARDI et al. (2004) citam que a lipólise nos produtos cárneos fermentados é predominantemente atribuída à atividade de lipases de origem endógena, cerca de 70 %. Às bactérias lipolíticas da cultura *starter*, da família *Micrococaceae*, atribui-se principalmente a redução de nitratos em nitritos. A ação das lipases musculares parece ser favorecida pelo baixo pH do salame, enquanto que as bactérias lipolíticas da cultura *starter* apresentam maior atividade em pH mais elevado.

A lipólise enzimática ocorre devido à especificidade de ação das lipases endógenas sobre triglicerídeos e pela ação das fosfolipases sobre os fosfolípídeos da membrana celular do músculo. As lipases atacam, preferencialmente, os ácidos graxos localizados na fração polar da molécula de triglicerídeo e os ácidos graxos da posição 3 em relação aos da posição 1, onde os ácidos graxos insaturados estão preferencialmente localizados. A quebra dos fosfolípídeos resulta em um significativo aumento do número de ácido graxos insaturados

livres no salame durante a maturação, principalmente os ácidos linoléico, oléico e araquidônico (ZANARDI et al., 2004).

A lipólise causada por enzimas musculares endógenas é resultante da ação de lipases mitocondriais e lisossômicas denominadas lipase ácida, fosfolipase A1 e A2, lipase neutra, esterase neutra e esterase ácida. A lipase ácida hidrolisa glicerídeos (mono, di e triglicerídeos) na faixa de pH entre 4,5 e 5,5, mostrando-se mais ativas em ambientes salgados e com baixa atividade de água, por isso sua ação é favorecida após a salga e início da secagem do salame. Por outro lado, a lipase neutra mostra-se ativa em pH entre 7,0 a 7,5. As fosfolipases A1 e A2 catalisam a hidrólise de 1-acil- e 2-acil ésteres, respectivamente.

As esterases ácida e neutra hidrolisam ácidos graxos de cadeia curta de mono, di e triacilgliceróis, sendo a esterase ácida ativada em substrato com baixos valores de atividade de água. A presença de grande quantidade de mioglobina no músculo pode inibir a ação da lipase neutra e da esterase neutra do músculo (CICHOSKI; TERRA, 2001).

Em produtos cárneos com longo período de maturação, as enzimas fosfolipases teriam grande atuação durante os primeiros cinco meses, enquanto que as lipases deixariam os triglicerídeos quase intactos nesse mesmo período. Embora permaneça ativa durante todo o período de maturação, as esterases apresentam ação limitada devido à pequena quantidade de ácidos graxos de cadeia curta no produto. No décimo mês, a quantidade de ácidos graxos livres gerada pela ação das fosfolipases diminui devido à alta suscetibilidade desses compostos à oxidação, havendo a formação de um grande número de substâncias voláteis e precursores de aromas. A temperatura de maturação, o teor de sal, o pH e o potencial redox do produto cárneo durante o processamento influenciam a ação das enzimas lipolíticas, podendo alterar as características sensoriais do produto final (CICHOSKI; TERRA, 2001).

Os ácidos graxos livres são mais suscetíveis à oxidação do que os ácidos graxos ligados aos triglicerídeos ou fosfolipídeos, característica comprovada pela redução no teor de ácidos graxos livres ao final do período de maturação. No entanto, alguns autores afirmam que o aumento da lipólise não está associado ao aumento da rancidez. As taxas de ácidos graxos livres podem alcançar no final do processo valores de 1% a 7% (ZANARDI et al., 2004). A lipólise é mais acentuada na carne suína do que na carne bovina, onde o grau de cominuição e o tamanho das partículas da matéria-prima parecem aumentar a atividade lipolítica. A idade e a genética dos animais também influenciam o sistema enzimático do músculo, afetando a qualidade final do produto cárneo (CICHOSKI; TERRA, 2001; ZANARDI et al., 2004).

Estudos relatam a atividade das enzimas endógenas lipase lipoproteína (básica), lipase hormônio-sensível (neutra) e lipase monoacilglicerol (ácida) sobre o tecido adiposo. A lipase lipoproteína do tecido adiposo é ativa em pH 8,5 e específica para monoacilgliceróis insaturados. A lipase hormônio-sensível hidrolisa a ligação éster dos triacilgliceróis, resultando em diacilgliceróis e possui máxima atividade em pH 7,0. Por sua vez, a lipase monoacilglicerol hidrolisa os monoacilgliceróis não tendo posição específica. Essas enzimas são ativas durante o período de salga, porém somente a lipase hormônio-sensível permanece ativa durante a secagem e maturação (CICHOSKI; TERRA, 2001).

PINTO; PONSANO; HEINEMANN (2001) descrevem que o hexanal é um dos principais produtos resultantes da oxidação de lipídeos, sendo encontrado em concentrações de 13 mg/ kg em carnes não curadas, enquanto que em produtos curados sua concentração é de somente 0,03 mg/ kg. Os autores citam ainda que além das bactérias da família *Micrococcaceae*, os lactobacilos também produzem lipase em níveis suficientes para contribuir significativamente com a formação de compostos aromáticos e sápidos derivados de lipídeos. A contribuição bacteriana para a lipólise em embutidos varia de 11% a 35% dependendo da cultura adicionada.

A oxidação dos ácidos graxos insaturados pode ocorrer durante a maturação e de certo modo pode ser útil para a formação de compostos que contribuem para o aroma e sabor do salame. Contudo, o excesso de oxidação pode alcançar níveis que geram rancidez, tornando o produto objetável para o consumo e podendo gerar compostos tóxicos à saúde. O estresse oxidativo é considerado o responsável por uma série de doenças crônico-degenerativas que podem afetar o fígado, os rins e o sistema cardiovascular, além de induzir o desenvolvimento de tumores e arteriosclerose (ZANARDI et al., 2004; TERRA; FRIES; KUBOTA, 2005). Dessa forma, o conhecimento das interações entre oxidantes e antioxidantes sobre a saúde humana torna-se muito importante.

Nos produtos cárneos fermentados, emprega-se substâncias oxidantes e antioxidantes. O cloreto de sódio apresenta atividade oxidante, enquanto que os nitritos e nitratos estão envolvidos em reações de óxido-redução. O decréscimo da atividade de água e o aumento da concentração de sal no salame durante a maturação favorecem a lipólise. O nitrito de sódio possui ação antioxidante, mediante a produção de óxido nítrico, apresentando efeitos positivos no controle da rancidez e da formação de aromas desagradáveis no produto. Além disso, o nitrito inibe a ação lipolítica de microrganismos contaminantes na carne. Outros ingredientes com ação antioxidante adicionados aos produtos cárneos são os ascorbatos, as

especiarias e os fosfatos. A ação antioxidante do nitrito também está provavelmente relacionada à sua ação quelante sobre o ferro heme liberado durante a moagem e mistura das matérias-primas, enquanto que as especiarias e o ascorbato ligam-se aos radicais livres impedindo a oxidação (ZANARDI et al., 2004).

2.1.1.4 Antioxidantes naturais em embutidos cárneos fermentados

Do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contêm pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos como o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT), largamente utilizados pela indústria de alimentos, ou naturais, substâncias bioativas como organosulfurados, fenólicos e terpenos. A ação dos antioxidantes não se restringe apenas à inibição da peroxidação dos lipídeos, mas também da oxidação de outras moléculas como proteínas e DNA (MELO; GUERRA, 2002).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primeiros atuam interrompendo a cadeia de reação oxidativa mediante a doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídeo-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Atuam como antioxidantes primários o BHT, BHA, ésteres do ácido gálico, butil-hidroquinona, tocoferol e flavonóides. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autooxidação, por mecanismos que incluem complexação de metais, seqüestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete, além de possuírem propriedade emulsificante. Os seqüestradores de oxigênio e quelantes de metais exibem efeito sinergista, uma vez que atuam como doadores de hidrogênio para o radical fenoxil, regenerando o antioxidante primário, ou inativam íons metálicos, neutralizando seu efeito pró-oxidante. O efeito sinérgico pode ser observado entre antioxidantes primários e entre estes e compostos não fenólicos como o ácido ascórbico e a lecitina. Cabe salientar que os antioxidantes não podem reverter o processo oxidativo nem prevenir a rancidez hidrolítica e por isso devem ser adicionados no início do processo de fabricação dos produtos cárneos ou na gordura utilizada como matéria-prima (MELO; GUERRA, 2002).

De acordo com MORETTO; FETT (1998), os antioxidantes podem ser classificados como compostos capazes de se transformar em radicais livres estabilizados por ressonância

devido à presença de um grupo fenólico em sua estrutura, eliminando os radicais livres dos ácidos graxos insaturados.

O interesse pelos antioxidantes naturais teve início nos anos 80 diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de BHT, BHA e t-BHQ (t-butilhidroquinona) sobre o peso do fígado e marcada proliferação do retículo endoplasmático das células, além do aumento da demanda por produtos naturais e orgânicos, especialmente nos Estados Unidos e na Europa. Assim sendo, seu uso nos alimentos tornou-se restrito e mais ênfase foi dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais, que possam atuar isoladamente ou sinergicamente com outros aditivos antioxidantes. (YAMADA, 2004; TERRA; FRIES; KUBOTA, 2005).

Os antioxidantes naturais geralmente são derivados de plantas ou ervas e sua ação pode variar dependendo da fonte das quais são extraídos, da presença de substâncias sinergistas ou antagonistas no alimento ou do produto nos quais são empregados (MELO; GUERRA, 2002; TERRA; FRIES; KUBOTA, 2005).

As evidências científicas permitem afirmar que a propriedade antioxidante das especiarias e de outros vegetais se deve principalmente a seus compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são fitoquímicos que apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, destacando-se entre os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural, os flavonóides, os ácidos fenólicos e o tocoferol (MELO; GUERRA, 2002). Os flavonóides encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e outras partes das plantas na forma de glicosídeos ou agliconas. Flavonóis, isoflavonas, flavonas e flavononas são algumas classes pertencentes ao grupo dos flavonóides, que se diferenciam principalmente pelo número e posição de hidroxilas e metoxilas presentes nos dois anéis aromáticos. As flavonas e os flavonóis são as duas principais classes encontradas universalmente na natureza, representados pelas agliconas, campferol, quercetina e miricetina e apigenina, luteolina e tricetina entre os mais comuns, respectivamente. Os ácidos fenólicos estão reunidos em dois grupos formados pelos derivados do ácido hidroxicinâmico e pelos derivados do ácido hidroxibenzóico. Entre os derivados do ácido hidroxicinâmico, os mais comumente encontrados na natureza são os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico. Esses ácidos existem nas plantas usualmente na forma de ésteres como o ácido clorogênico, éster do ácido quínico. No grupo dos ácidos hidroxibenzóicos destacam-se os ácidos protocatecuíco, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico. Os tocoferóis encontrados

principalmente em sementes oleaginosas e folhas exibem atividade antioxidante e de vitamina E.

Os tocoferóis estão agrupados em duas séries de compostos que possuem estrutura química semelhante e recebem o nome genérico de tocóis e tocotrienóis, atuando como antioxidantes primários (MELO; GUERRA, 2002).

Entre as plantas com propriedade antioxidante mais utilizadas em produtos cárneos destacam-se orégano, alecrim e sálvia, que possuem componentes com reconhecida atividade antioxidante como carnosol, ácido carnósico e ácido rosmarínico. Em produtos cárneos, verifica-se grande aumento da utilização dos extratos de orégano, alecrim e sálvia, purificados, desodorizados e com ausência de pigmentos, para prevenir a deterioração oxidativa desses alimentos e reduzir o emprego de antioxidantes sintéticos. Os extratos dessas plantas podem ser encontrados comercialmente na forma líquida e empregados nos produtos cárneos na concentração de 500 a 5.000 ppm, calculada sobre o teor total de gordura do alimento. Os extratos apresentam vantagens em relação às especiarias porque são livres de contaminação microbiológica, não são visíveis no produto, são de fácil armazenamento e transporte, além de permitirem padronização (TERRA; FRIES; KUBOTA, 2005; LEMOS, 2005).

Vários estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de extratos naturais, oriundos de plantas, que apresentem propriedades antioxidantes para uso em produtos cárneos. TERRA; FRIES; KUBOTA (2005) relatam recentes estudos com o uso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*), ervas do chá-verde e do chá-preto (*Camellia sinensis*), marcela do campo (*Achyrocline satureioides*) e casca da batata (*Solanum tuberosum*) que possuem flavonóides e ácidos fenólicos em sua composição.

MILANI et al. (2001) estudaram a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos etanólico e metanólico do chá verde, chá preto e erva-mate em carne mecanicamente separada de frango e verificaram que todos os extratos mostraram efeito antioxidante no referido produto. Em outro experimento, MILANI et al. (2002) estudaram a ação antioxidante dos extratos de casca de maçã, alcachofra e erva-mate sobre a carne mecanicamente separada de frango mantida sobre refrigeração e congelamento e verificaram que o extrato metanólico de erva-mate apresentou maior poder antioxidante em relação aos demais extratos.

A marcela do campo (*Achyrocline satureioides* (Lam). DC.) é uma planta nativa da América do Sul, muito empregada para fins medicinais no Brasil, Argentina, Uruguai e

Paraguai. Seu uso, em tribos indígenas do sul do Brasil, é indicado como reguladora da pressão sanguínea e para a melhoria dos sintomas associados a gripes e resfriados.

Essa indicação medicinal é validada por dados científicos relacionados à presença de sesquiterpenolactonas e flavonóides (relaxantes de músculos lisos, antivirais e bactericidas) na referida espécie, além de sua atividade excretora de potássio. As sementes de melancia, usadas como aditivo pelos indígenas, possuem atividade antibacteriana. Além disso, também são verificados relatos de sua atividade imuno-supressora leve, forte atividade antioxidante, fraca atividade larvicida, ação tripanossomicida sobre formas sangüíneas do *Trypanossoma cruzi*, atividade diurética e excretora de sódio negativa, atividade excretora de potássio aumentada, atividade antiinflamatória e fortalecedora da fagocitose (SENS, 2002).

A marcela do campo pertence à família *Asteraceae* e pode ser popularmente denominada de alecrim-de-parede, camomila nacional, carrapichinho-de-agulha, chá-de-lagoa, losua-do-mato, macela, macela-amarela, macela-do-mato, macelinha, marcela, marcela-da-terra, marcela galega ou paina. Seus constituintes químicos são óleo essencial, flavonóides como luteolina, isonafaliina, quercitina e galangina; ácidos polifenólicos e seus ésteres como ácido clorogênico, ácido isoclorogênico, protocatequilcalerianina e ácido caféico; fenilpironas, sesquiterpenos, compostos acetilênicos, canfeno, mirceno, saponinas, substâncias amargas (lactonas) e taninos. Devido à presença desses constituintes, à marcela do campo são atribuídas várias propriedades medicinais já citadas e outras que incluem a atividade antiasmática, antidiabética, antidiarréica, antiedematogênica externa e interna, antiepiléptica, antipirética, anticefaléia, protetora solar, sedativa, tônica, estimulante da circulação capilar e reguladora de disfunções gástricas, digestivas e hepáticas (PLANTAFARMA, 2005).

Em estudos sobre a atividade antioxidante da marcela do campo em células hepáticas de ratos, verificou-se que ambos os extratos da planta, aquoso e metanólico foram capazes de reduzir a produção de compostos resultantes da oxidação, apresentando significativo efeito redutor de radicais livres e poder antioxidante. Também foi relatado que o extrato aquoso da marcela do campo apresentou efeito inibitório sobre a oxidação do LDL (lipoproteína de baixo peso molecular) sangüíneo humano (TERRA; FRIES; KUBOTA, 2005).

TERRA; FRIES; KUBOTA (2005) relatam ainda estudos a respeito da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de marcela do campo sobre *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. FURTADO et al. (2004) verificaram que o extrato hidroetanólico de marcela do campo proporcionou proteção contra a oxidação lipídica em lingüiça,

demonstrando maior ação antioxidante quando comparado ao extrato hidroetanólico de erva-mate no mesmo produto.

2.2 BACTÉRIAS LÁCTICAS

2.2.1 Características Gerais

O grupo de bactérias lácticas está constituído por microrganismos associados a diversos alimentos incluindo plantas, como silagem, milho, hortaliças, cevada, carne e leite. As bactérias lácticas estão relacionadas com a produção de alimentos de alta e média acidez, da qual podem participar como coadjuvantes da fabricação de um grande número de alimentos, como leites fermentados, iogurtes, queijos, salames, presuntos, chucrute, pepinos e outros vegetais fermentados, sendo selecionados de acordo com o carboidrato a fermentar, normalmente a glicose, sacarose ou lactose. Originam-se de *habitats* específicos como vagina, boca e intestinos de mamíferos (BROCK; MADIGAN, 1991; SILVA; JUNQUEIRA, 1995; CARR; CHILL; MAIDA, 2002; HICKEY, 2002; FERREIRA, 2003).

As bactérias lácticas são microrganismos anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos que apresentam melhor desenvolvimento em meios com baixas tensões de oxigênio. Apresentam-se sob a forma de cocos ou bacilos, asporogênicos, não redutores de nitrato a nitrito, gelatinase negativos e incapazes de utilizar o lactato. São quimiorganotróficas, basicamente sacarolíticas, atuando preferencialmente sobre carboidratos. Classificam-se como mesófilas ou termófilas, com temperaturas ótimas de crescimento variando de 30 a 37° C e 45 a 50° C, respectivamente. São produtoras de ácido láctico como produto do metabolismo primário e ineficientes quanto à produção de energia, necessitando de grande quantidade de açúcar, vitaminas do complexo B e alguns aminoácidos, em determinadas espécies, para obtenção de energia suficiente para a biossíntese e reprodução (FERREIRA, 1987, KLEIN et al., 1998; CARR; CHILL; MAIDA, 2002; FERREIRA, 2003).

Esse grupo de microrganismos não possui catalase, com exceção de alguns pediococos, que produzem pseudocatalase. Algumas bactérias bífidas em presença de sangue ou de hematina também podem produzir catalase ou citocromos, formando uma cadeia de transporte de elétrons ativa e desta forma promovendo respiração. As bactérias lácticas reagem positivamente às colorações de gram, azul de metileno e rezarsurina, são usualmente

imóveis e obrigatoriamente fermentadoras (SÁ; BARBOSA, 1990; VEDAMUTHU et al., 1992; FERREIRA, 2003).

Foram primeiramente caracterizadas de acordo com sua habilidade em formar isômeros de ácido láctico a partir da fermentação da glicose. A rotação ótica obtida pela luz incidente sobre os isômeros de ácido láctico determinam a terminologia para os isômeros (D), dextro-rotatório quando a luz é desviada para a direita, (L) levo-rotatório quando a luz é desviada para a esquerda ou (DL) rancêmico quando há mistura dos dois primeiros tipos. A forma D (-) ácido láctico não é metabolizada pelos humanos e por isso não se recomenda o uso de bactérias lácticas produtoras desse isômero em alimentos destinados à alimentação infantil, sendo sua ingestão diária limitada em 100 mg/ kg de peso corporal (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; TERRA, 2003). De acordo com o produto final obtido da fermentação, as bactérias lácticas também podem ser classificadas em homofermentativas ou heterofermentativas. As homofermentativas produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação da glicose, enquanto que as heterofermentativas produzem diversos metabólitos como produtos resultantes da fermentação da glicose como ácido acético, CO₂ e etanol, além do ácido láctico. Esta característica de heterofermentação é resultante da produção da enzima fosfoquetolase que através da via pentose monofosfato permite às bactérias heterofermentativas a conversão de hexoses em pentoses, produzindo aldeídos e diacetil responsáveis pelo sabor e aroma altamente desejáveis em produtos alimentícios. As bactérias homofermentativas, por sua vez, possuem a enzima aldolase e são capazes de fermentar a glicose mais diretamente a ácido láctico (KANDLER; WEISS, 1986; CARR; CHILL; MAIDA, 2002). O grupo das bactérias lácticas homofermentativas inclui os gêneros *Streptococcus*, *Pediococcus* e os *Lactobacillus* homofermentativos, e o grupo heterofermentativo inclui os gêneros *Leuconostoc* e um subgrupo do gênero *Lactobacillus* (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

A fermentação das hexoses pelas bactérias lácticas pode ser realizada por diferentes vias metabólicas, porém em todas elas somente moléculas de fosfato de hexose com glico-configuração são atacadas. As rotas diferem no modo como é efetuada a quebra do esqueleto de carbono resultando em diferentes produtos finais. A glicólise promovida pelas bactérias homofermentativas caracteriza-se pela formação de glicose-6-fosfato a partir da glicose e sua conversão em frutose 6- fosfato. Posteriormente, há formação de 1,6 frutose difosfato, que com o auxílio da enzima aldolase gera gliceraldeído-3-fosfato ou dihidroxiacetona, resultando em duas moléculas de piruvato e duas moléculas de lactato como produto final.

Na heterofermentação, a glicólise inicia-se pela oxidação da glicose-6-fosfato para gluconato-6-fosfato, seguida pela descarboxilação e quebra da ribulose-5-fosfato, xilulose-5-fosfato em gliceraldeído-3-fosfato e acetilfosfato. Esse último resulta na formação de acetaldeído e etanol e o gliceraldeído origina piruvato e lactato. Podem ser formados a partir do piruvato, acetato e etanol em quantidades equimoleculares, mas também acetato e dióxido de carbono. Dois mecanismos explicam a conversão do piruvato em acetato e gás carbônico, cada um rendendo 1 mol de ATP por mol de piruvato. Um requer lipoato e coenzima A com o envolvimento de acetil CoA e acetilfosfato. No outro mecanismo, não é necessária a participação do lipoato ou da co-enzima A; o acetilfosfato é diretamente produzido durante o processo oxidativo, formando acetato e liberando dióxido de carbono (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; TERRA, 2003).

A fermentação da lactose, substrato bastante empregado para a fermentação de produtos cárneos, inicia-se primeiramente pela quebra da molécula pela enzima β galactosidase, resultando em glicose e galactose. A galactose é convertida em glicose-6-fosfato pela rota de Leloir e juntamente com a glicose é fermentada através da via glicolítica (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; TERRA, 2003).

Uma importante alternativa tecnológica para o incremento de sabor e aroma nos alimentos fermentados é a conversão do piruvato em acetoína e diacetil mediante duas diferentes rotas metabólicas. A formação de acetoína via acetolactato, seguida pela oxidação para diacetil, foi aceita como única possibilidade à rota metabólica da síntese do diacetil, porém, recentemente, acolheu-se a sua síntese direta a partir da acetil CoA. A formação de acetoína e diacetil é pequena quando as hexoses são as únicas fontes de carbono, porém este quadro é revertido quando surge no meio o piruvato proveniente da clivagem dos ácidos orgânicos. O balanço oxirredutor do sistema regula a extensão da formação dos flavorizantes como diacetil, aldeído acético, acetoína, butileno glicol e etanol (TERRA, 2003).

As bactérias homofermentativas utilizam a via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para gerar duas moléculas de lactato a partir de uma molécula de glicose, enquanto que as heterofermentativas produzem quantidades iguais de lactato, dióxido de carbono e etanol, mediante a fermentação da glicose pela via hexose monofosfato ou pela via pentose monofosfato (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

2.2.1.1 Gêneros e espécies de bactérias lácticas

Por várias décadas, foram considerados como verdadeiros componentes do grupo láctico os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e o recém denominado *Lactococcus* (VEDAMUTHU et al., 1992, CARR; CHILL; MAIDA, 2002; FERREIRA, 2003). Após inúmeras agregações, desagregações e reclassificações, juntamente com o aparecimento de novos gêneros, o grupo de bactérias lácticas está atualmente constituído por 15 gêneros de bactérias (Tabela 6).

TABELA 6 – GÊNEROS DE BACTÉRIAS DO GRUPO LÁCTICO E SUA MORFOLOGIA

GÊNEROS	MORFOLOGIA
<i>Aerococcus</i>	Cocos, pares/ aglomerados/ tétrades
<i>Atopobium</i>	Bacilos, pares
<i>Bifidobacterium</i>	Pleomorfos
<i>Brochothrix</i>	Cocos, ovóides/ pares
<i>Carnobacterium</i>	Bacilos, pares
<i>Enterococcus</i>	Cocos, isolados/ cadeia
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos, isolados/ pares/ cadeia
<i>Lactococcus</i>	Cocos, pares/ cadeias curtas
<i>Leuconostoc</i>	Cocos, ovóides/ pares/ cadeias curtas
<i>Oenococcus</i>	Cocos, ovóides/ pares
<i>Pediococcus</i>	Cocos, tétrades
<i>Streptococcus</i>	Cocos, isolados/ cadeias de tamanhos variados
<i>Tetragenococcus</i>	Cocos, ovóides/ pares/ tétrades
<i>Vagococcus</i>	Cocos, ovóides/ pares, tétrades
<i>Weissella</i>	Cocos, ovóides/ pares

FONTE: FERREIRA, 2003.

Entre os gêneros de bactérias lácticas, o gênero mais pesquisado tem sido o *Streptococcus*, sendo o *Streptococcus thermophilus* a única espécie desse gênero empregada na produção de alimentos, sendo também responsável pela produção de sabor característico no iogurte juntamente com o *Lactobacillus bulgaricus*. O atualmente denominado gênero

Lactococcus é o mais freqüente na composição de fermentos mesófilos para laticínios, do qual algumas espécies que apresentavam motilidade originaram o gênero *Vagococcus*.

As espécies *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e ssp. *diacetylactis* anteriormente pertencentes ao gênero *Streptococcus* diferenciam-se deste último por sua capacidade de crescer à temperatura de 10 °C. O gênero *Enterococcus* é composto por espécies que produzem ácido láctico na forma L(+), sendo representado principalmente por *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans*. As espécies desse gênero são resistentes a situações extremas de pH e temperatura, sendo muitas vezes referidas como contaminantes naturais, contribuindo para a textura e sabor de queijos artesanais. O gênero *Pediococcus* foi o primeiro grupo bacteriano estudado por Louis Pasteur devido à sua presença como contaminante em cervejas. São cocos agrupados em tétrades, produtores de pseudocatalase e produzem ácido láctico nas formas L(+), D(-) e DL. Não fermentam a lactose e são fracamente proteolíticos. O gênero *Brocothrix* originou-se da classificação original *Microbacterium* e é caracterizado por bacilos asporogênicos, catalase e citocromo positivos, isolados de produtos cárneos, estando mais próximos do gênero *Listeria* do que de outros gêneros de bactérias lácticas como o gênero *Lactobacillus*. O gênero *Carnobacterium* originou-se de espécies de *Lactobacillus*, devido a diferenças fenotípicas quanto à produção de metabólitos, crescimento em temperaturas de refrigeração, crescimento em diferentes faixas de pH e intolerância ao acetato. Além disso, as espécies do gênero *Carnobacterium* são deterioradoras de alimentos e apresentam patogenicidade (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; FERREIRA, 2003).

O gênero *Aerococcus* é homofermentativo, formando ácido láctico na forma L(+) e é pouco acidificante. A única espécie do gênero *Tetragenococcus* é o *T. halophilus*, caracterizado por não apresentar motilidade ou crescimento em pH 4,5 e em temperaturas de 10 e 45° C. Por sua vez, o gênero *Leuconostoc* é heterofermentativo, acumulando lactato na forma D(-), CO₂ e etanol ou acetato em partes iguais em meio contendo glicose e lactose como fontes de carbono. Algumas espécies utilizam o citrato e acumulam diacetil, aroma característico da manteiga e alguns tipos de queijos, sendo por isso utilizado como componente obrigatório de culturas mesofílicas produtoras de aroma. O gênero *Oenococcus* foi proposto em 1995 para a espécie *Leuconostoc oenus*, encontrada em bebidas alcoólicas como o vinho, devido ao seu crescimento em ambiente ácido (pH 4,8) e com elevada concentração de etanol (10%), sendo redenominada de *Oenococcus oenus*. O gênero

Lactobacillus está entre os que mais têm sido submetidos à desagregação, agregação e reclassificação.

Algumas espécies de *Lactobacillus* foram remanejadas e passaram a pertencer ao gênero *Weissella*, como *W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. kandleri*, *W. minor* e *W. viridescens* (FERREIRA, 2003).

O gênero *Bifidobacterium* foi descoberto e descrito pela primeira vez, em 1900, por Henry Tisser nas fezes de crianças amamentadas no seio materno. Essas bactérias habitam o intestino grosso do homem e diversos animais, sendo também encontradas no mel de abelhas, água de esgoto, em cáries dentárias, na secreção vaginal e em outros materiais biológicos humanos, estando classificadas em mais de 35 espécies reconhecidas (COLLINS; HALL, 1984; VIJAYENDRA; GUPTA, 1992; ISHIBASHI; SHIMAMURA, 1993; FERREIRA, 2003).

Esse grupo de bactérias apresenta-se sob a forma de bacilos gram-positivos, pleomorfos, bifurcados ou em forma de Y, não esporulados e imóveis. São anaeróbias, porém algumas espécies podem tolerar o O₂ somente na presença de CO₂ e apresentam crescimento ótimo à temperatura de 37 a 41° C e pH de 6,5 a 7,0, tendo seu desenvolvimento inibido em pH 4,5 a 5,0 e 8,0 a 8,5. Formam colônias lisas, convexas, brilhantes, brancas ou amareladas (KANDLER; WEISS, 1986).

Nutricionalmente, as bactérias bífidas formam um grupo bastante heterogêneo, necessitando de fatores nutricionais distintos para cada espécie. Entre os fatores nutricionais requeridos estão aminoaçúcares, em particular, N-acetil-D-glucosamina; oligossacarídeos; vitaminas, como riboflavina, ácido ascórbico, piridoxina, tiamina, biotina; e aminoácidos, como a cisteína, ácido pantotênico e ácido nicotínico (KANDLER; WEISS, 1986; KLAVER et al., 1993). Sacarolíticas; atuam basicamente sobre carboidratos, desempenhando papel significativo no controle do pH intestinal, através da liberação de ácido L (+) láctico e ácido acético na proporção 2:3, sem a liberação de CO₂ e por isso diferenciam-se das demais espécies de bactérias lácticas, pois metabolizam a glicose por uma via específica (frutose-6-fosfato).

As bactérias lácticas constituem um dos grupos predominantes da microflora intestinal de indivíduos saudáveis, desempenhando importante papel na manutenção do equilíbrio microbiano intestinal, pois a acidez gerada mediante a produção de ácidos orgânicos, em especial ácidos graxos voláteis, inibe ou restringe o crescimento de patógenos entéricos, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e algumas espécies de *Shigella* (SCARDOVI, 1986; IWATA; MORISHITA, 1989; VALENTIM et al., 1994). A inibição do crescimento de patógenos invasores também ocorre pela desconjugação de sais biliares e produção de bacteriocinas, como bifidolina e “bifilong” (ALVAREZ, 1988).

O gênero *Lactobacillus* apresenta-se sob a forma de bacilos ou cocobacilos gram positivos, isolados, aos pares ou formando correntes curtas, anaeróbios facultativos ou microaerófilos. Não formam esporos, são catalase e benzidina negativos, porém algumas espécies podem produzir pseudocatalase. São na maioria imóveis e crescem na faixa de 2 a 53° C (FERREIRA, 2003). Esse gênero foi primeiramente classificado por Orla e Jensen em três grupos (Thermobacterium, Streptobacterium e Betabacterium) de acordo com a temperatura de crescimento e características bioquímicas. Essa nomenclatura continua a ser empregada para definir os três grupos, porém sua classificação é realizada de acordo com a temperatura de crescimento, habilidade em fermentar pentoses, habilidade em produzir CO₂ a partir de glicose, necessidade de tiamina, redução de frutose a manitol, hidrólise de arginina e produção de ácido láctico como principal metabólito (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Ao grupo Betabacterium pertencem espécies heterofermentativas obrigatórias produtoras de CO₂ pela fermentação da glicose, sendo em sua maioria capazes de hidrolisar arginina e necessitando de tiamina para crescimento, enquanto que o grupo Streptobacterium, heterofermentativo facultativo, produz CO₂ a partir do gluconato e não da glicose. Ambos os grupos Betabacterium e Streptobacterium fermentam ribose e crescem bem em temperatura de 15° C, sendo classificados como mesófilos. O grupo Thermobacterium é composto por bactérias homofermentativas não fermentadoras de ribose, termofílicas que crescem à temperatura de 45° C ou superior (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; ANNUK, 2003).

A Tabela 7 mostra a divisão do gênero *Lactobacillus* de acordo com a habilidade fermentativa das espécies que o compõem.

TABELA 7 – CLASSIFICAÇÃO DO GÊNERO *LACTOBACILLUS* EM GRUPOS DE ACORDO COM SUA HABILIDADE FERMENTATIVA E ALGUMAS ESPÉCIES QUE OS COMPÕEM

GRUPO I Homofermentativo obrigatório <i>Thermobacterium</i>	GRUPO II Heterofermentativo Facultativo <i>Streptobacterium</i>	GRUPO III Heterofermentativo obrigatório <i>Betabacterium</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. bavaricus</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. cryspatus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. celobiosus</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. fructivoruns</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>L. hilgardii</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. murinus</i>	<i>L. kefir</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. panis</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>L. sanfrancisco</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	
<i>L. kefiranofaciens</i>	<i>L. plantarum</i>	
<i>L. salivarius</i> ssp. <i>salivarius</i>	<i>L. rhamnosus</i>	
<i>L. salivarius</i> ssp. <i>salicinus</i>		

FONTE: FERREIRA, 2003.

Os métodos atuais de taxonomia aplicados às bactérias lácticas incluem sua caracterização fenotípica e genotípica. Na caracterização fenotípica utilizam-se métodos padronizados baseados em reações bioquímicas e enzimáticas onde são analisadas a composição da parede celular, proteínas solúveis totais do citoplasma e mobilidade eletroforética de certas enzimas. A análise do genótipo é baseada na amplificação da sequência das bactérias através de técnicas de DNA-DNA hibridização, provas genéticas e técnicas de ribotipagem (KLEIN et al., 1998; ANNUNUK et al., 2003).

A Tabela 8 mostra algumas redenominações e alterações de gênero ocorridas para espécies de *Lactobacillus*.

TABELA 8 – NOMENCLATURAS DE ALGUMAS ESPÉCIES DE *LACTOBACILLUS*

NOMENCLATURA ANTERIOR	NOVA NOMENCLATURA
<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>L. delbrueckii ssp. lactis</i>
<i>L. jugurti</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>L. divergens</i>	<i>Carnobacterium divergens</i>
<i>L. piscicola</i>	<i>Carnobacterium piscicola</i>
<i>L. minutus</i>	<i>Atopobium minutum</i>
<i>L. rimae</i>	<i>Atopobium rimae</i>

FONTE: FERREIRA, 2003.

A espécie *Lactobacillus casei* pertence ao grupo Streptobacterium e é comumente encontrada no leite, queijo, derivados lácteos e também em carnes. A espécie tem sido relatada como probiótica devido às suas ações benéficas exercidas no organismo quando presente no trato intestinal. No entanto, ao longo dos anos, a espécie de *L. casei* e suas subespécies têm sofrido inúmeras reclassificações e redenominações. KANDLER; WEISS (1986) classificaram a espécie *L. casei* em cinco subespécies: *ssp. alactosus*, *ssp. casei*, *ssp. pseudoplatantarum*, *ssp. rhamnosus* e *ssp. tolerans*. *L. casei alactosus* difere de *L. casei ssp. casei* devido à sua inabilidade em fermentar lactato (KLEIN et al., 1998).

A diferenciação inicial entre *L. casei*, *L. alactosus* e *L. rhamnosus* feita por KANDLER; WEISS (1986) foi baseada na habilidade em crescer a 15 e 45° C e na fermentação da lactose e ramnose. *L. rhamnosus* cresce em ambas as temperaturas referidas e pode ser identificado bioquimicamente pela incapacidade de fermentar a rafinose, habilidade em fermentar ramnose e apresentar ácido meso-diaminopimélico em sua parede celular.

Posteriormente, foi proposto por COLLINS; PHILLIPS; ZANONI (1989) que as subespécies *alactosus*, *pseudoplatantarum*, *rhamnosus* e *tolerans* fossem elevadas à categoria de espécie baseado em sua baixa homologia com a cepa *L. casei ssp. casei*. Propuseram ainda a nova espécie *L. paracasei* dividida nas subespécies *paracasei* e *tolerans*.

A subespécie *paracasei* se caracteriza por crescer em temperaturas de 10 e 40°C, não apresentar motilidade, produzir L (+) ácido láctico a partir de amidalina, arbutina, celobiose, frutose, galactose, glicose, maltose, manitol, manose, melezitose, N-acetilglicosamina, salicina, turanose e trealose e não hidrolisar arginina, esculina ou uréia (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). A subespécie *tolerans* caracteriza-se por crescer em temperaturas de 10 e 37° C, não crescendo a 40° C. Forma células que ocorrem isoladas ou em cadeias e fermenta frutose, galactose, glicose, lactose, manose, N-acetilglicosamina e tagatose, sendo incapaz de hidrolisar arginina, esculina e uréia.

De acordo com KLEIN et al. (1998), a descrição da nova espécie *L. paracasei* foi baseada somente em um limitado número de experimentos, verificando a homologia DNA-DNA complementados por uma pobre descrição das características fenotípicas das cepas. Neste sentido, somente *L. rhamnosus* poderia ser facilmente distinguido das demais espécies por possuir e ser capaz de fermentar ramnose, enquanto que *L. casei* e *L. paracasei* não poderiam ser facilmente diferenciados bioquimicamente. Na reclassificação proposta por DICKS et al. (1996), o termo *paracasei* deveria ser rejeitado e suas subespécies incluídas na espécie *L. casei*, sendo ainda reempregado o termo *L. zae* para a cepa *L. casei* ATCC 393.

KLEIN et al. (1998) estudaram a relação fenotípica e genotípica entre espécies probióticas isoladas de produtos lácteos, produtos farmacêuticos, trato gastrointestinal e urogenital humano e de alguns animais, e seus resultados confirmaram a proposta de DICKS et al. (1996) para a red denominação das espécies do grupo *L. casei*. Verificaram também que a maioria das culturas probióticas identificadas no rótulo dos produtos analisados não apresentava a designação apropriada para sua espécie. ANNUNUK et al. (2003) afirmam que frequentemente a classificação fenotípica dos *Lactobacillus* em gêneros e espécies não corresponde à sua categoria filogenética quando comparadas através da análise da sequência do 16S RNA ribossômico desses microrganismos. Desta forma, as dificuldades encontradas na taxonomia dos lactobacilos prejudica a indicação de cepas de uma determinada espécie para uso como probióticos (PENNACCHIA et al., 2004).

As red denominações sugeridas para *L. zae* e *L. rhamnosus* (Tabela 9) foram aprovadas pelo Comitê Internacional de Bacteriologia Sistemática (ICSB), porém a inclusão das subespécies de *L. paracasei* na espécie *casei* ainda permanece em discussão e não está aprovada.

TABELA 9 – REDENOMINAÇÕES PROPOSTAS PARA A ESPÉCIE *LACTOBACILLUS CASEI*

KANDLER; WEISS (1986)	COLLINS; PHILLIPS; ZANONI (1989)	DICKS et al. (1996)
<i>L. casei ssp. alactosus</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. casei ssp. casei</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. zeae/ L. casei</i>
<i>L. casei ssp. pseudoplatantarum</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. casei ssp. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
<i>L. casei ssp. tolerans</i>	<i>L. paracasei ssp. tolerans</i>	<i>L. casei</i>

FONTE: FERREIRA, 2003.

L. rhamnosus apresenta-se como bacilos não móveis, heterofermentativos, que crescem em temperatura de 10° C, porém alguns em 15 e 45° C. Essa espécie produz L (+) ácido láctico e fermenta amidalina, arbutina, celobiose, frutose, galactose, beta-gentiobiose, gluconato, glicose, lactose, manitol, manose, maltose, melezitose, N-acetilglicosamina, ramnose, ribose, salicina, sorbitol, turanose e trealose. Não possui a capacidade de hidrolisar arginina e uréia, porém hidrolisa esculina (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

2.2.2 Atividade Benéfica e Antimicrobiana das Bactérias Lácticas

Às bactérias lácticas são atribuídas propriedades nutritivas, medicinais e terapêuticas em virtude de sua ação benéfica sobre a flora intestinal, pois aderem-se a diversos epitélios do sistema digestivo. Autores citados por GOULET (1991) observaram que diversas cepas lácticas possuíam propriedades imunoestimulantes, as quais não estariam ligadas à viabilidade das células, pois também eram encontradas em cultivos inativados pelo calor.

Em estudo realizado por ANNUK et al. (2003), verificou-se que cepas heterofermentativas do gênero *Lactobacillus* como *L. casei* e *L. paracasei* mostraram maior inibição de bactérias gram negativas patogênicas quando comparadas aos lactobacilos homofermentativos, devido à alta redução de pH promovida no meio, causando maior efeito deletério sobre as bactérias patogênicas.

Entre os lactobacilos, o *Lactobacillus acidophilus* produz substâncias antibacterianas, tais como proteínas inibitórias, peróxido de hidrogênio, lactocidina, acidolina, acidofilina e lactacium-B.

A redução de B-glucoronidase fecal e atividade nitrorredutase também estão associadas à ingestão de células viáveis desse microrganismo, assim como a inibição da enzima hidroximetil-glutaril-CoA-redutase, reguladora da síntese de colesterol sanguíneo (VIJAYENDRA; GUPTA, 1992).

Os principais mecanismos de inibição de competidores das bactérias lácticas são a formação de ácidos orgânicos, como ácido láctico e acético, e possivelmente a produção de bacteriocinas. Outros metabólitos produzidos pelas bactérias lácticas mostraram poder de inibir bactérias Gram negativas em experimentos laboratoriais, porém há pouco interesse em seu estudo para o aumento da segurança e estabilidade de produtos cárneos, pois alguns não são produzidos em quantidades suficientes (reuterina) ou interferem nas características sensoriais (diacetil e peróxido de hidrogênio), enquanto outros têm seu uso restrito e controlado (ácido benzóico) (LÜCKE, 2000).

O domínio das bactérias lácticas sobre a flora competitiva nas carnes fermentadas é favorecido pelas condições anaeróbicas do processo, adição de sais de cura e açúcares e pelo baixo pH inicial da mistura (pH menor que 5,8). Uma queda rápida de pH abaixo de 5,3 mostra-se importante na inibição de salmonelas e *Staphylococcus aureus* quando os produtos são fermentados em temperaturas abaixo de 18 °C (LÜCKE, 2000).

Em carnes, o principal ácido formado pelas bactérias lácticas é o ácido láctico, sendo que somente pequenas concentrações de ácido acético são toleradas sensorialmente nos produtos. Por outro lado, o efeito antimicrobiano deste ácido mostra-se mais efetivo em comparação ao ácido láctico nas mesmas concentrações e pH. A sensibilidade bacteriana a esses ácidos é bastante variável e depende de outros fatores como atividade de água e presença de nitrito. Por isso, em produtos cárneos fermentados, até mesmo pequenas diferenças na concentração desses ácidos podem promover grandes efeitos sobre bactérias pouco tolerantes à acidez. A intensidade do sabor ácido depende do valor de pH, porém uma alta concentração de ácido acético torna o sabor ácido menos puro e mais "azedo". A adição de acidificante como glucona-delta-lactona (GDL) à massa do embutido pode gerar acúmulo de ácido acético devido à ação de lactobacilos, principalmente *L. sakei* e *L. plantarum* sobre o

ácido glucônico gerado a partir do GDL com formação do ácido acético (TERRA, 1998; LÜCKE, 2000).

2.2.2.1 Bacteriocinas

As bactérias lácticas têm sido estudadas não somente por suas habilidades fermentativas, mas também por sua capacidade em produzir compostos com propriedades antimicrobianas denominados bacteriocinas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As bacteriocinas constituem um grupo específico de substâncias bactericidas que, semelhantes aos antibióticos, são altamente específicas, tanto quanto a natureza do microorganismo produtor, quanto a dos microrganismos sobre os quais são letais. Isoladas ou em combinação com outros agentes antimicrobianos, as bacteriocinas atuam como ferramentas úteis na redução de patógenos e/ou bactérias deteriorantes nos alimentos (BARRETO et al., 2004).

As bacteriocinas são proteínas ou peptídeos antimicrobianos destruídos por proteases na porção superior do trato intestinal, originando aminoácidos e que despertam grande interesse para a segurança alimentar. Por isso, diferentemente dos antibióticos, esses compostos podem ser utilizados em alimentos, pois não são absorvidos na sua forma ativa e não interferem com a microbiota intestinal. Essas substâncias são produzidas por cepas de todos os gêneros de bactérias lácticas de relevância em carnes, mostrando-se capazes de inibir bactérias do gênero *Listeria*, porém somente algumas são efetivas contra *Bacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus*. Estudos também descrevem a ação antimicrobiana das bacteriocinas sobre *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fragi*, *P. fluorescens*, *P. putrefaciens* e *Salmonella typhimurium* (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

KLAENHAMMER (1993) propôs uma divisão das bacteriocinas em quatro grupos: grupo I, que compreende as bacteriocinas da família dos lantibióticos, grupo II, composto por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular e grupos III e IV, representados por proteínas termolábeis de alto peso molecular, acima de 30 KDa. O grupo I é caracterizado por conter aminoácidos não usuais como dehidroalanina (Dha), dehidrobutirina (Dhb), lantionina e beta-metilantionina. Esses aminoácidos são formados pela modificação translacional da serina e treonina em suas formas dehidro. O aminoácido dehidro reage com a cisteína, formando anéis de tioéster de lantionina, que passam a receber o nome de lantibióticos. A nisina pertence a esse grupo de bacteriocinas.

O grupo II é representado por bacteriocinas formadas de peptídeos não modificados com peso molecular inferior a 5 KDa, divididas em três subgrupos: subgrupo IIa, sintetizado com um peptídeo líder ligado, o qual é removido por processo proteolítico e contém as bacteriocinas pediocina PA-1, sacacina A e P, leucocina A, bavaricina MN e curvacina A, que possuem atividade contra *Listeria monocytogenes*; subgrupo IIb, que requer dois peptídeos diferentes para sua atividade e contém as lactococinas G, M e lactacina F; e subgrupo IIc que requer baixas concentrações de cisteína para sua atividade, sendo composto pela lactacina B. O grupo III é representado pelas helvetinas J e V (*Lactobacillus helveticus*), lactacina A, lactacina B e enterolisina (*Enterococcus faecium*), enquanto que o grupo IV é composto pela leuconocina S (*Leuconostoc*), lactocina-27 e pediocina SJ-I. As bacteriocinas desse grupo contêm metades constituídas por lipídeos e carboidratos (BARRETO et al., 2004).

Os mecanismos de ação das bacteriocinas sobre a célula bacteriana têm sido bastante estudados. Acredita-se que sua ação inibitória ocorra pela formação de poros na membrana citoplasmática das células sensíveis, haja vista que vários tipos de bactérias gram positivas apresentam diferentes graus de sensibilidade às bacteriocinas pela composição e permeabilidade distintas nas membranas (ANNUK et al., 2003).

De acordo com LÜCKE (2000), as bactérias gram negativas são menos suscetíveis à ação de bacteriocinas devido à presença de membrana externa que não permite seu efeito sobre a membrana citoplasmática. O tratamento das culturas gram negativas com agentes quelantes que permeabilizam a membrana externa, o aquecimento ou congelamento em níveis subletais ou o uso de ultra alta pressão pode sensibilizar essas bactérias gram negativas como *Salmonella* à ação de bacteriocinas. Além disso, as bactérias gram negativas são mais sensíveis aos ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias lácticas em comparação com as bactérias gram positivas (ANNUK et al., 2003).

PENNACCHIA et al. (2004) descrevem estudos sobre o emprego de bacteriocinas produzidas por algumas cepas de *Pediococcus* e *Lactobacillus* para a inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes*, bactéria considerada como um dos principais agentes patogênicos em carnes.

A bacteriocina mais estudada e empregada na preservação de alimentos é a nisina, produzida por certas linhagens de *Lactococcus lactis* ssp *lactis*, a qual em 1989 foi reconhecida pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como substância segura GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para utilização em alimentos (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

O uso da nisina é permitido em queijos pasteurizados para prevenir o crescimento indesejável de *Clostridium botulinum* e em leites não fermentados, frutas enlatadas, vegetais, carnes, pescado e cerveja, na proporção de 500 a 10.000 UI por grama de alimento. O uso da nisina também é indicado para preservar o aroma dos alimentos e prevenir a fermentação maloláctica precoce em vinhos quando a fermentação alcoólica ainda não está encerrada, prevenindo o crescimento de bactérias lácticas contaminantes que interferem no equilíbrio de sabor, aroma e características estéticas do vinho. A ação da nisina sobre os microrganismos indesejáveis está baseada na inativação de grupos sulfídrica da membrana citoplasmática, causando extravasamento de conteúdo intracelular e na prevenção de sua esporulação (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Nos produtos cárneos, a ação das bacteriocinas pode ser menor que a esperada, pois comumente verifica-se que seu efeito é mais efetivo em alimentos líquidos do que em sólidos, além disso sua atividade pode ser reduzida pela conjugação de moléculas com componentes do alimento, pela ação desestabilizadora de proteases e outras enzimas e pela distribuição desigual na matriz alimentícia (LÜCKE, 2000).

Segundo SCHILLINGER, KAYA e LÜCKE (1991), relatados por LÜCKE (2000), o efeito limitado das bacteriocinas em carnes deve-se à sua baixa estabilidade nesse tipo de produto pela interação com componentes da membrana da célula muscular.

2.2.3 Probióticos

Os alimentos probióticos são aqueles que carregam ou são produzidos por bactérias probióticas originadas do trato intestinal humano quando o produto se destina ao consumo humano ou do trato intestinal de uma determinada espécie animal quando se destina à alimentação animal. Esses alimentos fazem parte do mercado de alimentos funcionais e estão disponíveis em vários formatos principalmente como formulações para animais, produtos farmacêuticos, produtos de confeitaria e produtos lácteos fermentados ou não (FERREIRA, 2003).

Durante um longo período de tempo, a tendência para o desenvolvimento de novos produtos na indústria de alimentos consistia na remoção ou diminuição de componentes dos alimentos considerados prejudiciais à saúde.

A tendência atual consiste na adição de substâncias com efeitos benéficos à saúde, entre as quais incluem-se os probióticos, que estão já sendo utilizados em bebidas lácteas, fórmulas para alimentação infantil, produtos fermentados à base de soja, sucos de frutas, sorvetes e barras de cereais (HUGAS; MONFORT, 1997; BEJDER, 2004).

2.2.3.1 Mercado dos alimentos probióticos e funcionais

Alimentos funcionais são definidos como aqueles que além da nutrição básica, podem promover saúde ou reduzir riscos de doenças quando consumidos em quantidades tradicionais. O termo surgiu no Japão no final da década de 80 como resposta da indústria de alimentos a um apelo do governo japonês, devido ao aumento na incidência de doenças crônico-degenerativas na população japonesa da terceira idade, gerando uma série de produtos alimentícios, regulamentados em julho de 1991, com o nome de *Foods for Specified Health Use* – FOSHU, definidos como “produtos alimentícios ou componentes do alimento e suas participações cientificamente reconhecidas na manutenção da saúde, redução dos riscos de doenças crônicas e modificação das funções fisiológicas” (STANTON et al., 2001; ISHIBASHI, 2002; PENNA, 2002b). Os alimentos funcionais carreadores de bactérias probióticas representam 65% dos alimentos funcionais comercializados no mundo (SANTOS; FERREIRA; COSTA, 2003).

Em 1994, o mercado global de produtos probióticos movimentou US\$ 6,6 bilhões, sendo liderado pelo Japão com mais de US\$ 3,3 bilhões. No ano 2000, o volume comercializado ultrapassou US\$ 17 bilhões com grande participação dos Estados Unidos da América, onde a legislação para esse tipo de produto tornou-se mais favorável do que na Europa e Japão. No Reino Unido também houve grande crescimento no mercado de alimentos probióticos nos últimos anos, onde cerca de 85% das bebidas lácteas fermentadas possuem essa característica funcional (BEJDER, 2004). Segundo dados levantados por FERREIRA (2003), o mercado mundial de produtos probióticos movimenta mais de US\$ 20 bilhões.

No Japão, o mercado de probióticos disponibiliza mais de 50 produtos lácteos com diferentes tipos de microrganismos viáveis. No mercado mundial estão disponíveis mais de 100 diferentes produtos contendo bactérias bífidas e lactobacilos, verificando-se a tendência da utilização de culturas mistas com mais de uma espécie ou gênero de bactéria láctica no mesmo produto.

Nos Estados Unidos e no Brasil, a maioria dos produtos probióticos contém estirpes de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* ssp, porém se observa o crescimento de produtos com outras cepas de *Lactobacillus*, como *L. casei* e *L. rhamnosus* e também cepas do gênero *Propionibacterium* (FERREIRA, 2003; THARMARAJ; SHAH, 2003).

Pesquisas de mercado relatadas por STANTON et al. (2001) mostram que o público consumidor de alimentos funcionais é composto predominantemente por indivíduos do sexo feminino, com alto grau de escolaridade, idade entre 35 e 55 anos e com grande preocupação com a saúde. Contudo, verifica-se um aumento da conscientização da população em geral sobre o conceito de alimento funcional e os benefícios que trazem à saúde.

2.2.3.2 Microbiota intestinal

As espécies de microrganismos probióticos são originárias trato intestinal, no entanto algumas espécies também podem ser encontradas como componentes da flora microbiana da cavidade oral e vaginal (HAMMES; HERTEL, 1998).

A microbiota do trato gastrointestinal é um ecossistema de alta complexidade, contando cerca de 100 trilhões de bactérias pertencentes a mais de 400 diferentes espécies. No intestino grosso humano, três níveis distintos de microbiota podem ser observados. A microbiota dominante está constituída por 99% da população e representada somente por bactérias anaeróbias estritas dos gêneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* e *Bifidobacterium*. A microbiota sub-dominante (0,99%) é representada predominantemente por bactérias anaeróbias facultativas como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e alguns *Lactobacillus*, enquanto que a microbiota residual (0,01%) contém uma grande variedade de bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Veillonella* e da família *Enterobacteriaceae*, mas também leveduras e protozoários. Essas microbiotas são responsáveis por funções importantes na saúde do hospedeiro, pois inibem a multiplicação de microrganismos exógenos no local (resistência à colonização), promovem a imunomodulação, permitindo uma resposta imune mais rápida e adequada e contribuem nutricionalmente fornecendo vitaminas e substratos energéticos e reguladores na forma de ácidos graxos voláteis (NICOLI et al., 2003; NESTLÉ, 2004).

PENNA (2002a) relata que em recém-nascidos alimentados exclusivamente com leite materno, a microbiota intestinal é representada basicamente por bactérias do gênero *Bifidobacterium* (85% a 95%), as quais tendem a diminuir ao longo dos anos, tornando necessária a reposição desses microrganismos na vida adulta.

Em trabalho realizado por O' SULLIVAN et al. (1992), as bactérias lácticas e bífidas apresentavam-se como os microrganismos mais abundantes e mais uniformemente distribuídos pelo trato intestinal, destacando-se como principais espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. cellobiosus*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. pseudolongum* e *Pediococcus pentosaceus*. JAHREIS et al. (2002) relatam que as espécies de lactobacilos mais freqüentes na mucosa oral e intestinal de humanos sadios são *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei* ssp. *paracasei*, tendo sido isolados em 52%, 26% e 17% dos indivíduos, respectivamente.

Os microrganismos do trato intestinal convivem em relações simbióticas ou antagônicas crescendo nos componentes dos alimentos que são ingeridos ou nas secreções do trato intestinal do hospedeiro. Embora a composição dessa microbiota seja estável em indivíduos saudáveis, ela pode ser alterada por diversos fatores como dieta, estresse, drogas, estado imunológico, quimioterapia, envelhecimento ou enfermidades que causam transtornos gastrintestinais (TESHIMA, 2003).

As bactérias nocivas podem formar compostos tóxicos entre os quais substâncias putrefativas como amônia, gás sulfídrico, aminas, fenol, indol e escatol, como também ácidos biliares secundários que prejudicam a atividade intestinal, contribuindo para o processo de envelhecimento e aparecimento de tumores (MITSUOKA, 1992). Bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterim* fazem parte da microbiota benéfica do intestino delgado e grosso, respectivamente e sua introdução no hospedeiro é feita pela administração de produtos probióticos (TESHIMA, 2003).

As espécies probióticas mais utilizadas para inferir funcionalidade aos produtos lácteos estão apresentadas na Tabela 10.

TABELA 10 – PRINCIPAIS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS E SEUS RESPECTIVOS PRODUTOS DE METABOLISMO

ESPÉCIES	PRODUTOS DE METABOLISMO
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	L (+) lactato, acetato *
<i>Bifidobacterium breve</i>	L (+) lactato, acetato
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	L (+) lactato, acetato
<i>Bifidobacterium infantis</i>	L (+) lactato, acetato
<i>Bifidobacterium longum</i>	L (+) lactato, acetato
<i>Enterococcus faecium</i>	L (+) lactato
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DL lactato
<i>Lactobacillus casei</i>	L (+) lactato
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	L (+) lactato
<i>Lactobacillus reuterii</i>	DL lactato, CO ₂

FONTE: FERREIRA, 2003.

* Acetato: lactato na proporção 3:2.

2.2.3.3 Características das bactérias lácticas para uso como probióticos

Considera-se como probióticas as cepas de microrganismos que possuem a capacidade de resistir a condições ácidas, à ação da bile e lisozima e colonizar o trato intestinal humano, ao menos temporariamente, mediante mecanismos de adesão às células intestinais. Além dessas características, somam-se outras condições complementares necessárias às culturas probióticas: capacidade de ativação, rápido crescimento e permanência no intestino por um período aceitável, resistência aos antibióticos normalmente presentes nos alimentos, porém sensibilidade àqueles usados em tratamentos contra bactérias lácticas (penicilinas e aminoglicosídeos) e ausência de propriedades patogênicas, tóxicas, alérgicas, mutagênicas ou carcinogênicas (HUGAS; MONFORT, 1997).

Para INCZE (1998), as cepas probióticas devem ainda se apresentar em número viável de células, pertencer naturalmente ao intestino, possuir extensa ação contra microrganismos patogênicos, apresentar potencial ação imunológica, capacidade fermentativa e formação de sabor e aroma típicos de alimentos fermentados.

Vários critérios têm sido usados para a seleção de cepas probióticas para uso humano, os quais podem ser classificados em três grupos: segurança, funcionalidade e viabilidade tecnológica. Para que o uso do probiótico seja seguro é necessário que a cepa seja originária de indivíduos saudáveis. Os aspectos funcionais incluem a tolerância da cultura probiótica à acidez gástrica e à toxicidade da bile, atividade antioxidante, produção de compostos antimicrobianos, habilidade em modular a resposta imune e adesão ao epitélio intestinal. Por

sua vez, os aspectos tecnológicos englobam a habilidade das cepas em suportarem as condições de processamento industrial e a formulação do produto, permanecendo viáveis no produto final (McCANN; EGAN; WEBER, 1995; ANNUNUK, et al., 2003).

Frente às dificuldades de seleção de organismos probióticos resistentes às condições anteriormente citadas, pode-se utilizar como alternativa dietética para o aumento de bactérias benéficas no intestino o emprego de ingredientes alimentares não digeríveis pelo hospedeiro denominados prebióticos. Os prebióticos não devem ser hidrolisados ou absorvidos na parte superior do trato gastrointestinal, devendo ser fermentados e promover o crescimento seletivo ou estimular a atividade metabólica das bactérias benéficas. São utilizados como prebióticos, os fruto-oligossacarídeos (FOS) e inulina, além de galacto-oligossacarídeos, lactulose, isomalto-oligossacarídeo, xilo-oligossacarídeo, gentio-oligossacarídeo e oligossacarídeos de soja. O FOS consiste de moléculas de sacarose, nas quais uma, duas ou três unidades adicionais de frutose são adicionadas por ligações glicosídicas β (2-1) à molécula de frutose que compõe a sacarose. O grau de polimerização é de 11 a 60 unidades monoméricas. Os alimentos contendo microrganismos probióticos suplementados com prebióticos num único produto são denominados simbióticos (FERREIRA, 2003; TESHIMA, 2003).

A estabilidade microbiana do intestino delgado, onde a flora benéfica é representada principalmente pelos lactobacilos, pode ser comprometida pela presença de secreções luminais, pela dieta, a qual também é responsável pela introdução de bactérias exógenas no intestino e por situações de estresse. As contínuas renovações do epitélio intestinal também comprometem a adesão dos lactobacilos nesse local e a adoção da prática do consumo de doses repetidas de *Lactobacillus* pode contribuir para a manutenção dessa flora benéfica. Desta forma, os alimentos probióticos que carregam *Lactobacillus* exigem um consumo diário por um determinado período de tempo. Por outro lado, o intestino grosso, cuja flora benéfica está predominantemente representada pelas bifidobactérias, é uma região mais estável, de difícil alteração pelo consumo de probióticos, porém é a primeira a ser afetada pela presença de antibióticos. Por tratarem-se de microrganismos anaeróbios estritos e serem pouco resistentes ao baixo pH, o cultivo *in vitro* e a veiculação das bactérias bífidas em alimentos fermentados não são realizados com facilidade. Neste sentido, a estratégia para o balanceamento dessa região é o consumo de substâncias prebióticas que estimulam de maneira seletiva as bifidobactérias e por isso são chamadas de fatores bifidogênicos (FERREIRA, 2003).

2.2.3.4 Ação benéfica dos probióticos no organismo humano

Ao consumo de probióticos estão associados vários efeitos benéficos à saúde, como o melhor trânsito intestinal dos alimentos facilitando a digestão, o alívio dos sintomas de intolerância à lactose, aumento da resposta imune, redução dos episódios de diarreia, prevenção ou supressão de câncer de cólon e redução do colesterol sanguíneo (HEENAN et al., 2002).

Os sais biliares, sintetizados a partir do colesterol hepático e liberados no intestino delgado após ingestão de alimentos que contêm gorduras, atuam como detergentes com ação deletéria aos microrganismos, haja vista a membrana celular microbiana ser composta por lipídeos e ácidos graxos. No entanto, alguns microrganismos são capazes de hidrolisar os sais biliares mediante a ação de uma enzima denominada sais biliares hidrolase (BSH), diminuindo sua solubilidade e enfraquecendo sua ação detergente. Essa enzima é encontrada em várias espécies microbianas incluindo *Lactobacillus*, porém a resistência aos sais biliares varia entre as espécies deste gênero (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000). Embora a concentração de sais biliares no trato intestinal sofra variações, a concentração mínima recomendada para a seleção de bactérias probióticas resistentes aos sais biliares é de 0,3% (ERKKILÄ; PETAJA, 2000; PENNACCHIA et al., 2004).

Os ácidos biliares conjugados são importantes para a emulsificação, digestão e absorção dos lipídeos pelo organismo, porém quando estão na forma desconjugada sua ação é grandemente enfraquecida (JAHREIS et al., 2002).

SANTOS; FERREIRA; COSTA (2003) afirmam que a enzima BSH, produzida por diversas bactérias probióticas catalisa a hidrólise dos aminoácidos glicina e ou tarina que estão conjugados aos ácidos biliares, alterando a solubilidade desses ácidos, os quais em pH inferior a 5,5 apresentam fraca propriedade detergente. A capacidade da microbiota intestinal em desconjugar ácidos biliares pela ação da enzima BSH (sais biliares hidrolase) pode influenciar o nível de colesterol sanguíneo. Esse fenômeno tem sido considerado por muitos autores como o principal mecanismo de ação dos probióticos na redução do colesterol. Os ácidos biliares desconjugados absorvem baixa quantidade de lipídeos do trato gastrointestinal, aumentando a excreção do colesterol na forma de coprostanol e reduzindo sua absorção no intestino. Esses ácidos biliares desconjugados são menos solúveis em pH baixo e precipitam, induzindo a uma co-precipitação do colesterol, sendo juntamente eliminados nas fezes (KLAVER; MEER, 1993).

Uma vez que os ácidos biliares desconjugados são eliminados, maior quantidade de colesterol é requerida para a síntese de novos sais biliares no fígado, diminuindo os níveis de colesterol sérico (TESHIMA, 2003).

A modulação da colesterolemia pelo emprego de probióticos é realizada por diversos mecanismos que agem sobre o metabolismo dos lipídeos, como a redução da absorção intestinal de colesterol, aumento da excreção de esteróides fecais e bloqueio da síntese de colesterol pelo organismo (SANTOS; FERREIRA; COSTA, 2003).

Os ácidos graxos de cadeia curta produzidos no intestino pelas bactérias probióticas, a partir da fermentação de açúcares não digeridos pelo organismo humano, podem causar decréscimo nos níveis sanguíneos de lipídeos pela inibição da síntese hepática de colesterol ou redistribuição do colesterol sanguíneo para o fígado. Além disso, alguns probióticos interferem na absorção intestinal de colesterol pela desconjugação dos sais biliares ou assimilação direta do colesterol. Estudos sobre a ação das bactérias probióticas na redução do teor de lipídeos séricos em humanos sugerem que em indivíduos portadores de hiperlipidemia, os efeitos benéficos devem-se primariamente à redução do colesterol e em indivíduos normolipidêmicos, os efeitos são predominantemente sobre os triglicerídeos séricos (PEREIRA; GIBSON, 2002).

TANAKA et al. (1999) verificam que bactérias originárias do trato intestinal de mamíferos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* apresentavam grande atividade da enzima BSH e concluíram que a atividade dessa enzima está correlacionada ao habitat dos microrganismos e que por isso, apenas os produtos carreadores de bactérias probióticas originadas do trato intestinal teriam efeito na redução da colesterolemia. Desta forma, as bactérias carreadas no iogurte que não são de origem intestinal não teriam efeito hipocolesterolemizante pelo mecanismo de desconjugação dos ácidos biliares.

Os ácidos graxos de cadeia curta, predominantemente acetato, propionato e butirato, são os principais produtos da fermentação das bactérias benéficas no intestino grosso e possuem papel importante na manutenção do crescimento e integridade da mucosa intestinal, pois diminuem o pH colônico protegendo o cólon contra carcinogênese através da redução da biodisponibilidade de aminas tóxicas. Pesquisas têm verificado que o butirato produzido inibe o crescimento de colonócitos irregulares e promove o reparo do DNA celular, inibindo a incidência de câncer de cólon (SANTOS; FERREIRA; COSTA, 2003). Apesar dessas evidências, os mecanismos que modulam a atividade anticarcinogênica exercida pelas bactérias probióticas sobre o cólon ainda permanecem em estudo (RAFTER, 2003).

GLUCK; GEBBERS (2003) verificaram que a ingestão regular de alimentos contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus* GG, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus thermophilus* podem reduzir a colonização das bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos beta-hemolíticos e *Haemophilus influenzae* sobre o trato respiratório, indicando haver interação do tecido linfático entre o trato respiratório e o trato intestinal.

A redução do pH intestinal proporcionada pelas bactérias probióticas aumenta a concentração de cálcio ionizado e conseqüentemente sua difusão passiva pela membrana das células intestinais com aumento da resistência óssea. YABARRA et al. (2003) indicam que há uma relação benéfica entre probióticos, prebióticos e minerais, principalmente cálcio, magnésio e ferro. Tem-se comprovado, recentemente, o efeito positivo na absorção desses minerais pelo emprego dos probióticos e prebióticos, cujos prováveis mecanismos estejam relacionados com o aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta, diminuição do pH intestinal e solubilização de cálcio, magnésio e ferro complexados, aumento de proteínas relacionadas com a absorção dos minerais, além da hiperplasia da mucosa intestinal com o aumento da área de absorção.

As bactérias benéficas do trato intestinal também são capazes de sintetizar vitamina K e as bactérias do gênero *Bifidobacterium* podem sintetizar vitaminas do complexo B, como vitamina B₁, B₆, B₉, B₁₂ e ácido nicotínico (TESHIMA, 2003).

O aumento da resposta imune promovido pelas bactérias probióticas parece estar associado ao aumento de várias atividades do sistema imune que incluem a ativação de macrófagos e linfócitos, produção de anticorpos e resposta proliferativa no baço e em placas de Peyer (CARLOS et al., 2003). O consumo de probióticos pode aumentar a atividade fagocitária das células intestinais de defesa do organismo, mediando a resposta imunológica nas inflamações e infecções intestinais (JAHREIS et al., 2002).

Os probióticos também podem contribuir na redução dos transtornos causados pela intolerância à lactose, visto melhorarem a sua digestibilidade. Esta capacidade está baseada em algumas teorias: pela estimulação da atividade da β -galactosidase na mucosa intestinal do hospedeiro ou pela digestão intrainestinal da lactose pela β -galactosidase produzida pelas bactérias lácticas durante o trânsito intestinal ou a colonização do intestino (MARTINI et al., 1991, OUWEHAND; SALMINEN; ISOLAURI, 2002; TESHIMA, 2003).

HIRANO et al. (2003) estudaram a capacidade de *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. casei* e *L. plantarum* em inibir a adesão e colonização das células epiteliais do cólon humano por *Escherichia coli* enterohemorrágica e verificaram que as cepas de *L. rhamnosus* apresentaram grande adesão ao epitélio intestinal, impedindo a penetração de *E. coli* nas células intestinais. Os probióticos atuam formando uma barreira protetora no intestino ao ocupar nichos nas células epiteliais da mucosa intestinal onde os patógenos poderiam se estabelecer (PONTES et al., 2003).

Algumas culturas probióticas têm sido utilizadas na prevenção de alergias alimentares principalmente em crianças. Embora a etiologia não esteja esclarecida, evidências indicam que em crianças com sintomas alérgicos, as espécies de bactérias bífidas diferem daquelas encontradas em crianças saudáveis. Nas crianças alérgicas predominam nas fezes *Bifidobacterium adolescentis*, enquanto que nas crianças saudáveis predominam *B. breve* e *B. bifidum*. Também é relatado o uso de bactérias probióticas para aliviar os efeitos maléficos de enfermidades como dermatite atópica, síndrome de Crohn, artrite reumatóide, colite ulcerativa, gastroenterite aguda causada por rotavírus e em casos de diarreia associada à antibioticoterapia. A bactéria probiótica *Lactobacillus* GG possui a capacidade de aumentar a resposta imunológica frente ao rotavírus, aumentar a produção de anticorpos e imunoglobulina A (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; FERREIRA, 2003).

A encefalopatia portal sistêmica, doença causada pela circulação de substância tóxicas no sangue, como amônia, fenóis, aminas ativas e indol em decorrência de doenças hepáticas que impossibilitam o fígado em detoxificar o sangue poderia ter seus efeitos reduzidos com o uso de probióticos. A redução do pH intestinal promovida pelas bactérias lácticas transforma grande parte da amônia tóxica na forma não ionizada (NH_3) em amônia na forma iônica (NH_4^+), que não é absorvida por difusão passiva. Essa alteração no equilíbrio entre as formas ionizada e não ionizada da amônia pode influenciar o deslocamento da amônia sangüínea para o cólon, reduzindo seu nível no sangue (TESHIMA, 2003).

OCAÑA; HOLGADO; NADER-MACÍAS (1999) estudaram a habilidade de cepas de *Lactobacillus paracasei* produtoras de peróxido de hidrogênio em inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* para verificar sua eficiência como probiótico para uso local no trato vaginal. Nesse estudo observou-se que as cepas de *L. paracasei* produziram 0,46 mmoles/ L de peróxido de hidrogênio, quantidade suficiente para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* na concentração de 1,1 a $2,4 \times 10^4$ de células viáveis/ mL.

Estudos realizados ANNUNUK et al. (2003) evidenciaram que as células microbianas de bactérias lácticas probióticas foram capazes de apresentar defesa contra compostos oxidantes, sugerindo que essa ação antioxidante possa ser utilizada para diminuir os efeitos maléficos de radicais livres no organismo humano. No mesmo trabalho, verificou-se também que bactérias heterofermentativas facultativas como *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* apresentaram maior atividade inibitória contra bactérias patogênicas em relação às bactérias homofermentativas e heterofermentativas obrigatórias e mostraram crescimento estável sob diferentes condições de disponibilidade de oxigênio, indicando seu possível uso como probióticos administrados via oral, com ação efetiva ao longo de todo o trato intestinal onde há porções microaerófilas e porções anaeróbias.

A Tabela 11 relaciona as atividades funcionais no hospedeiro com as espécies de bactérias probióticas que as realizam.

TABELA 11 – FUNCIONALIDADE DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS AVALIADAS NA ESPÉCIE HUMANA

ESPÉCIES PROBIÓTICAS	FUNÇÃO
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. bifidum</i>	Equilíbrio da microbiota intestinal
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Estímulo do sistema imune
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. gasseri</i>	Redução de enzimas fecais
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescentis</i>	Ação antitumorigênica
<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	Prevenção da diarreia dos viajantes causada por <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
<i>L. rhamnosus</i>	Prevenção da diarreia pseudomembranosa causada por <i>Clostridium difficile</i>
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. bifidum</i>	Prevenção de diarreias devido a antibioticoterapia ou quimioterapia
<i>L. acidophilus</i> , <i>B. breve</i>	Controle de colonização intestinal em recém-natos após antibioticoterapia
<i>B. bifidum</i> , <i>L. casei</i>	Tratamento de diarreia causada por rotavírus
<i>L. acidophilus</i>	Diminuição do colesterol sérico

FONTE: FERREIRA, 2003; BORBA; FERREIRA, 2003.

Os procedimentos a serem adotados para a avaliação de segurança, registro e comercialização de probióticos no Brasil estão padronizados na Resolução nº 02 de 07 de janeiro de 2002 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Nessa resolução, os probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo, devendo constar no rótulo dos produtos probióticos a quantidade dos microrganismos viáveis, que garanta a ação alegada dentro do prazo de validade. Esta informação deve estar próxima à alegação de propriedade funcional e ou de saúde do produto e fora da tabela de informação nutricional (BRASIL, 2002).

Ao longo dos últimos cinco anos, a Comissão de Assessoramento Técnico-Científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF) para a ANVISA reavaliou os produtos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde aprovados desde o ano de 1999. Utilizou como base os conhecimentos científicos atualizados, bem como relatos e pesquisas que demonstram as dificuldades encontradas pelos consumidores em entender o verdadeiro significado da característica anunciada para determinados produtos contendo alegações funcionais. Com essa revisão, alguns produtos deixaram de ter alegações e outros tiveram as suas alegações modificadas para aprimorar o entendimento dos consumidores quanto às propriedades desses alimentos. De acordo com a revisão, os microrganismos aprovados como probióticos são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rammosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* e *Streptococcus salivarius* subespécie *thermophilus* (NIC – PARQUE TECNOLÓGICO DE LONDRINA, 2005).

2.3 USO DE CULTURAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS EM PRODUTOS CÁRNEOS

As culturas que são adicionadas aos produtos cárneos fermentados com a função de inibir patógenos e aumentar o período de vida útil, sem promover grandes alterações nas características físicas e sensoriais, são denominadas culturas protetoras, enquanto que culturas probióticas são, por definição, aquelas que após ingestão em número suficiente exercem efeitos benéficos à saúde, além de seu efeito nutricional (HAMMES; HERTEL, 1998; LÜCKE, 2000).

O uso de culturas probióticas é bastante difundido na indústria láctea, sendo rara sua utilização em produtos cárneos (LÜCKE, 2000).

O sucesso dos probióticos em produtos lácteos está principalmente embasado nas evidências científicas dos efeitos benéficos proporcionados por alguns microrganismos (TYÖPPÖNEN et al., 2003). Em produtos cárneos, os efeitos benéficos devem ser comprovados com o consumo desses produtos. Ainda não parece possível concluir, a partir dos resultados obtidos com produtos lácteos, que uma espécie probiótica terá o mesmo efeito em outro tipo de produto. Isto porque as ações e propriedades dos microrganismos dependem dos fatores ambientais. Além disso, há poucos estudos sobre o número de bactérias probióticas que devem ser ingeridas nos produtos cárneos, necessário para obter os efeitos desejados (HAMMES; HERTEL, 1998). Estima-se que o consumo de células viáveis de bactérias probióticas para obtenção de efeitos benéficos e temporária colonização do intestino seja de 10^9 a 10^{10} UFC/ de acordo com as contagens de 10^6 a 10^8 UFC de células viáveis encontradas em 1 g de fezes. Neste sentido, para um produto cárneo fermentado contendo 10^8 células viáveis/ g, a dose diária mínima de consumo poderia ser de 10 a 100 g do produto (PENNA, 2002a; TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Por suas características de crescimento e produção de metabólitos, os lactobacilos mesófilos e as bifidobactérias são considerados como os melhores microrganismos para serem usados como probióticos em produtos cárneos, necessitando para isso resistir ao processo de fermentação da carne e sobreviver à passagem pelo estômago e intestino delgado para poder exercer suas atividades probióticas (LÜCKE, 2000).

Quando não adicionados intencionalmente à carne, a presença de lactobacilos probióticos pode ser decorrente de contaminação fecal. *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei* são os lactobacilos mais comumente encontrados na cavidade oral e trato intestinal de pessoas saudáveis e por isso a ocorrência natural dessas bactérias na carne não é freqüente (PENNACCHIA et al., 2004). Por outro lado, diversos estudos têm demonstrado a viabilidade do uso de lactobacilos probióticos em produtos cárneos fermentados. ARIHARA et al. (1998) estudaram a aplicação de *Lactobacillus gasseri* para aumentar a segurança microbiológica de produto cárneo fermentado. A utilização de *Lactobacillus rhamnosus* e *L. paracasei* subsp. *paracasei* para a fermentação de produtos cárneos foi estudada por SAMESHIMA et al. (1998).

ERKKILÄ et al. (2000) realizaram experimentos utilizando cepas probióticas de *L. rhamnosus* GG e cepas potencialmente probióticas de *L. rhamnosus* LC- 705 e VTT-97800 para a fabricação de salames.

ANDERSEN (1998) demonstrou a possibilidade de fermentação de produto cárneo pela mistura de uma cultura *starter* tradicional Bactoferm T-SPX (Chr Hansen) e uma cultura potencialmente probiótica de *L. casei* LC-01 e pela mistura da mesma cultura *starter* com uma cultura de *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

Estudos relatados por ERKKILÄ et al. (2001a) mostram o potencial efeito probiótico de cepas de *Lactobacillus gasseri*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. casei* e *Bifidobacterium lactis* utilizadas para a fermentação de salame.

A inibição da colonização e virulência de *Listeria monocytogenes* no trato intestinal de ratos pelo consumo de produto cárneo fermentado adicionado de culturas *starter*, culturas probióticas e *Listeria monocytogenes* foi testada por MAHONEY; HENRIKSSON (2003). Os resultados mostraram que a cultura *starter* composta por *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus* e as culturas probióticas compostas por *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* e bactérias do gênero *Bifidobacterium* foram capazes de inibir o crescimento de *Listeria* durante sua passagem pelo trato gastrointestinal. Verificou-se também um possível efeito protetor da massa do salame sobre a mucosa intestinal, por envolver a bactéria patogênica em sua matriz, não permitindo a adesão e colonização do intestino, havendo eliminação do patógeno nas fezes.

Para a introdução de produtos cárneos probióticos no mercado consumidor há necessidade de estudos mais aprofundados sobre a efetiva viabilidade das culturas probióticas nesses produtos e ação benéfica ao organismo, tendo como grande perspectiva o desenvolvimento de culturas *starter* com características probióticas que proporcionem ao produto cárneo as mesmas características sensoriais e tecnológicas que as culturas *starter* tradicionais, além das ações benéficas (HAMMES; HERTEL, 1998; LÜCKE, 2000).

A sobrevivência dos probióticos ao suco gástrico depende de sua habilidade em tolerar baixos valores de pH. O pH no estômago proporcionado pela excreção de ácido clorídrico é de 0,9, no entanto a presença de alimento no estômago aumenta este valor para níveis próximos de 3,0. Após a ingestão, o alimento sofre ação no estômago por 2 a 4 horas. Devido à sensibilidade da maioria das bactérias aos baixos valores de pH do estômago, as bactérias probióticas devem ser ingeridas juntamente com o alimento, pois este atua como um tampão sobre a elevada acidez estomacal, permitindo a sobrevivência das bactérias durante o trânsito gástrico (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; TYÖPPÖNEN et al., 2003).

A carne, assim como o leite, possui características tamponantes em ambientes ácidos, podendo, desta forma, proteger os probióticos do ambiente hostil do estômago (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Em produtos cárneos fermentados, as bactérias lácticas crescem em locais específicos, sendo encapsuladas pela matriz constituída por carne e gordura. Os componentes da carne e da gordura que não foram digeridos nas primeiras porções do trato gastrointestinal podem atuar como fonte de energia para o desenvolvimento das bactérias no intestino (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

O desenvolvimento de probióticos para produtos cárneos fermentados pressupõe o uso de bactérias probióticas resistentes ao nitrito e ao cloreto de sódio, capazes de crescer rapidamente durante a fermentação, assim como apresentar resistência à acidez estomacal, à lisozima e à bile, mostrando capacidade de colonizar o trato intestinal humano através de mecanismos de aderência ou ligação às células intestinais (PAPAMANOLI et al., 2003). O uso da carne como carreador de probióticos também pode proteger esses microrganismos da ação letal da bile (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Além de proporcionar maior vida útil e consistência aos produtos cárneos fermentados, as novas culturas *starter* probióticas devem ser facilmente cultiváveis em escala industrial e resistirem a processos de congelamento e liofilização, assim como contribuir para a qualidade sensorial do produto final (ERKKILÄ et al., 2001a).

No sentido de direcionar o processamento de alimentos probióticos, deve-se levar em conta alguns fatores como a adequação da cultura ao público alvo do produto, a funcionalidade no intestino delgado ou grosso esperada para a espécie, a sobrevivência da espécie no alimento, a produção de ácido láctico na taxa esperada, a não alteração do sabor, aroma e textura originais do produto, a resistência da espécie à acidez do produto, à acidez do estômago e à presença de bile ou outras secreções intestinais e a viabilidade e número mínimo de células viáveis que deve ser de 10^6 UFC/ g para *Lactobacillus* e 10^7 UFC/ g para *Bifidobacterium* (ANDERSEN, 1998; LÜCKE, 2000; FERREIRA, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

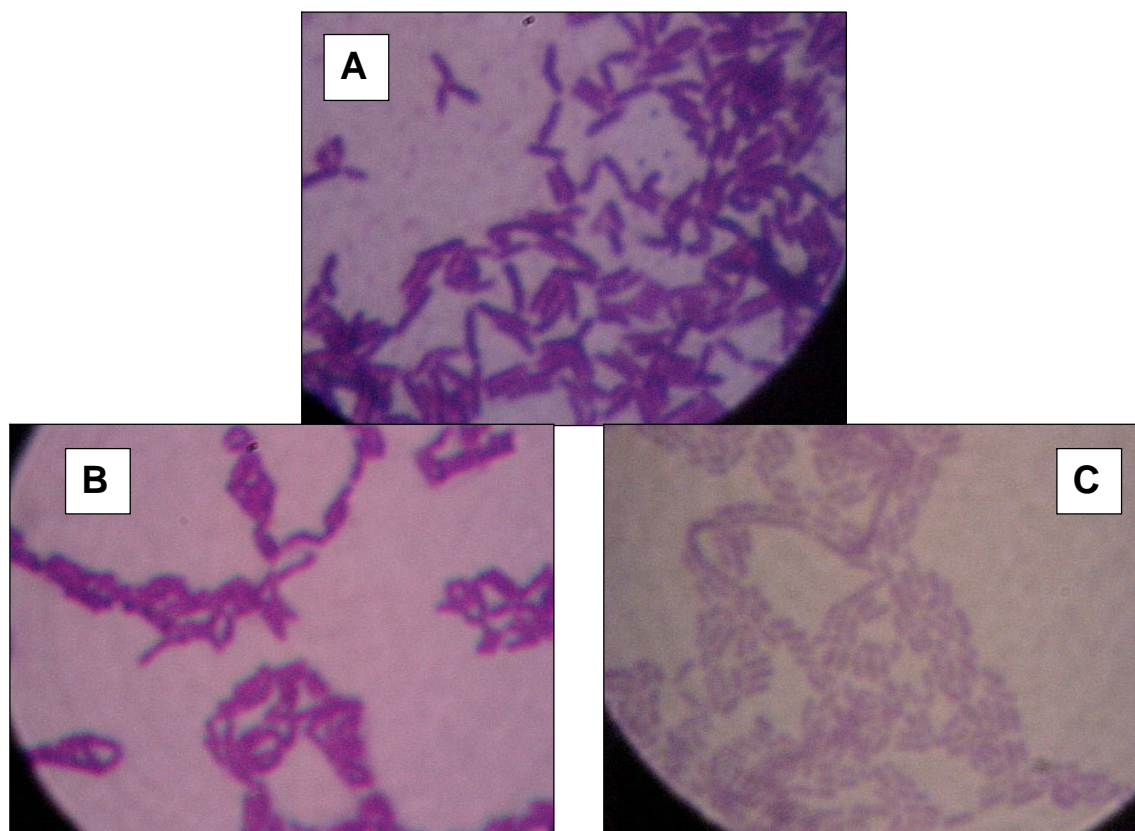
3.1.1 Microrganismos

Nos embutidos fermentados produzidos no presente trabalho utilizou-se como cultura *starter* a cultura comercial Bactoferm T-SPX contendo os microrganismos *Staphylococcus xylosus* DD-34 e *Pediococcus pentosaceus* PC-01 (CHR HANSEN, Dinamarca). A cultura *starter*, caracterizada como um pó de cor branca com partículas levemente amarronzadas, foi obtida sob a forma liofilizada acondicionada em sachês de alumínio da empresa LC Bolonha, Curitiba-PR. O uso dos microrganismos da cultura *starter* assegura rápida acidificação inicial no produto, porém com pH final alto, além de coloração estável e sabor aromático (CHR HANSEN, 2003).

Como culturas probióticas foram testadas as seguintes espécies de *Lactobacillus*: *Lactobacillus casei* (LC 01 CHR HANSEN, Dinamarca) obtida sob a forma liofilizada e fornecida pela empresa LC Bolonha; *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (ATCC 10746/ CCT 0566) e *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* (ATCC 7469/ CCT 6645) obtidas sob a forma reativada em ágar MRS da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, Campinas-SP.

De acordo com o catálogo de culturas da American Type Culture Collection (ATCC, 2005), a cultura de *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* ATCC 7469 está classificada como *Lactobacillus rhannosus* e foi descrita neste trabalho como uma subespécie de *Lactobacillus casei*, pois foi fornecida pela Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello com a referida denominação. A Figura 4 mostra a morfologia celular das espécies de *Lactobacillus* utilizadas, podendo-se verificar que as células de *L. casei* ssp. *rhannosus* apresentam-se mais curtas em comparação às células de *L. casei* e *L. paracasei*.

FIGURA 4 - MORFOLOGIA CELULAR DE *LACTOBACILLUS CASEI* (A), *LACTOBACILLUS PARACASEI* SSP. *PARACASEI* (B) E *LACTOBACILLUS CASEI* SSP. *RHAMNOSUS* (C) EM MICROFOTOGRAFIA DE TRANSMISSÃO DE LUZ (1.000 X) E COLORAÇÃO DE GRAM



FONTE: O AUTOR.

As culturas probióticas testadas têm seu uso tradicional em produtos lácteos fermentados e sua escolha para utilização em embutidos baseou-se em estudos prévios publicados que demonstraram seu potencial para uso em produtos cárneos.

3.1.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as indicações do fabricante ou formulados conforme recomendações da literatura. Os principais meios de cultura e nutrientes para crescimento microbiano utilizados foram: caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS,

OXOID), ágar MRS (OXOID), ágar nutriente tamponado (OXOID), ágar-ágar (OXOID), caldo nutriente (OXOID), ágar Baird Parker (OXOID) e peptona bacteriológica (MERCK).

3.1.3 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados para a realização dos experimentos estão relacionados a seguir:

- agitador de tubos (QUIMIS);
- aparelho para determinação de atividade de água (AQUALAB CX-2);
- autoclave vertical de laboratório (PHOENIX);
- balança analítica (GEHARA AG 200 SÉRIE FL 7919);
- balança semi-analítica (MARTE LC 5);
- banho-maria (FANEM MDL 146);
- câmara de incubação B.O.D. (FANEM, MDL 347 CD);
- capela de fluxo laminar (VECO, MDL VLFS-9);
- centrífuga de Gerber simples (ITR);
- centrífuga refrigerada (EPPENDORF MDL 5810R);
- colorímetro portátil (HUNTERLAB MINISCAN XE PLUS);
- embutideira manual (JAMAR) com capacidade para 8 litros;
- espectrofotômetro (MILTON ROY MDL 21D);
- estufa bacteriológica (FANEM 502);
- higrotermômetro digital portátil (FRANCE);
- homogeneizador de amostras para microbiologia (IUL MDL CE 2000);
- máquina embaladora a vácuo (SELOVAC CV 18);
- microscópio ótico binocular (NIKON MDL YS2-H);
- potenciômetro digital de inserção (TESTO MDL 230);
- refrigerador (CONSUL BIPLEX 450)

3.1.4 Matérias-primas e Ingredientes

As matérias-primas e os ingredientes usados para a elaboração dos embutidos fermentados foram semelhantes àqueles utilizados na fabricação do salame tipo italiano, haja vista que o salame italiano possui características sensoriais valorizadas pelo consumidor brasileiro, típica dos embutidos do Mediterrâneo, de baixa acidez e pronunciado sabor e aroma.

A carne suína magra congelada (paleta), carne bovina congelada (dianteiro) e toucinho congelado foram obtidos de um frigorífico e fábrica de embutidos da cidade de São José dos Pinhais-PR. Os ingredientes sal comum (CISNE), nitrato de sódio e nitrito de sódio, glicose, sacarose e acelerador de cura composto de eritorbato de sódio, sacarose e ácido cítrico (New Cor F014, DOREMUS) foram adquiridos no comércio local e os condimentos pimenta branca moída, alho em pó e noz moscada foram adquiridos no Mercado Municipal de Curitiba-PR.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Teste de Sensibilidade das Culturas Lácticas aos Sais de Cura (NaCl e NaNO₂)

As culturas de *Lactobacillus casei* (LC 01 CHR HANSEN), *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* (ATCC 10746) e *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* (ATCC 7469) foram testadas quanto à resistência ao cloreto de sódio adicionado ao ágar MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) (De MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960; CARR; CHILL; MAIDA, 2002) nas concentrações de 1%, 1,5%, 2%, 2,5% e 3%. Os testes de resistência ao nitrito foram realizados pelo mesmo procedimento utilizando concentrações de 80, 100, 120, 150 e 200 ppm adicionadas ao ágar MRS (ARIHARA; ITOH, 2000).

As culturas lácticas foram primeiramente repicadas em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de caldo MRS e incubadas a 37° C por 24 horas para sua reativação. Após reativação, procedeu-se a diluição dos inóculos em água peptonada 0,1% até concentração 10^{-7} . Posteriormente, semeou-se 1 mL desta concentração em placas de Petri contendo ágar MRS adicionado das diferentes concentrações de sais de cura. Paralelamente, também foram semeadas alíquotas de 1 mL dos inóculos em ágar MRS puro (teste controle) para comparação do crescimento das culturas. Utilizou-se a técnica de semeadura em profundidade (*pour plate*) visto que as bactérias lácticas são microrganismos microaerófilos. A incubação das placas ocorreu em estufa bacteriológica a 37° C, durante 48 horas. A avaliação do crescimento das culturas probióticas foi realizada pela contagem das colônias presentes nos meios de cultura com diferentes concentrações de sais de cura, sendo os resultados expressos por UFC/ mL e comparados com o teste controle (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

3.2.2 Teste de Sensibilidade das Bactérias Lácticas Probióticas e das Bactérias Lácticas da Cultura *Starter* aos Antimicrobianos

As bactérias lácticas da cultura *starter* e as bactérias lácticas probióticas foram testadas frente a 20 antimicrobianos pelo método de disco-difusão (Tabela 12). Partindo-se de 10 mL de caldo MRS com as culturas pré-ativadas por 24 horas a 37° C, foram realizados esfregaços utilizando *swab* em ágar MRS. Após a secagem do esfregaço no ágar foram depositados sobre sua superfície dez discos de antimicrobianos (LABORCLIN), utilizando-se duas placas para cada microrganismo. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37° C e a sensibilidade aos antimicrobianos verificada pelo diâmetro em milímetros dos halos de inibição formados ao redor do disco (LABORCLIN, 2003).

Na formulação de produtos cárneos fermentados tradicionalmente empregam-se bactérias lácticas denominadas de culturas *starter*. Na formulação dos embutidos produzidos neste trabalho utilizou-se como cultura *starter* a cultura mista de *Staphylococcus xylosus* e *Pediococcus pentosaceus*. Este último, por tratar-se de bactéria láctica deve ter sua contagem diferenciada das culturas lácticas probióticas adicionadas à massa do produto. Dessa forma, a adição de substâncias inibitórias ao meio de cultura promove o crescimento seletivo de uma única espécie de bactéria láctica permitindo sua contagem isoladamente.

TABELA 12 – DISCOS DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS UTILIZADOS NO TESTE DE SENSIBILIDADE DAS CULTURAS LÁCTICAS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES

DISCO DE SUBSTÂNCIA ANTIMICROBIANA	CONCENTRAÇÃO NO DISCO
Amoxicilina+ácido clavulânico	20/ 10 µg
Ampicilina	10 µg
Bacitracina	0,04 UI
Cefalexina	30 µg
Cefalotina	30 µg
Ciprofloxacina	5 µg
Clorafenicol	30 µg
Eritromicina	15 µg
Estreptomicina	10 µg
Gentamicina	10 µg
Imipenem	10 µg
Kanamicina	30 µg
Neomicina	30 µg
Norfloxacina	10 µg
Oxacilina	1 µg
Penicilina G	10 unid.
Rifampicina	30 µg
Sulfonamida	300 µg
Tetraciclina	30 µg
Vancomicina	30 µg

A confirmação do crescimento seletivo dos pediococos na presença de tetraciclina ocorreu pela contagem de cepas puras de *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* spp. *paracasei* e *L. casei* spp. *rhannosus* em ágar MRS com a adição de 10 mg/ L de tetraciclina e sem a adição do antibiótico.

A partir da solução de 0,05 g de tetraciclina (SIGMA Chemical Co.)/ 100 mL de água destilada foram adicionados 20 mL da solução em 1000 mL de ágar MRS, obtendo-se a concentração desejada de antibiótico no meio de cultura. As culturas puras foram diluídas em água peptonada estéril 0,1% e o plaqueamento das diluições 10^{-2} a 10^{-9} realizado pela técnica *pour plate*. As placas inoculadas em duplicata com e sem a adição do antibiótico foram incubadas a 37° C por 48 horas para a contagem do número de colônias (THARMARAJ; SHAH, 2003).

3.2.3 Produção de Embutido Cárneo com Culturas Probióticas

Para a elaboração do embutido fermentado adicionado de culturas probióticas foram conduzidos três experimentos. Em cada experimento foram testados diferentes tratamentos objetivando identificar a cultura probiótica mais adequada para o produto, o aprimoramento das características sensoriais e a estabilidade do embutido e da cultura probiótica durante o armazenamento. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia de Produtos Agropecuários, *Campus* São José dos Pinhais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Nos três experimentos utilizou-se a mesma formulação básica para a fabricação do embutido cárneo (Tabela 13), assim como o mesmo procedimento de preparo da massa e embutimento.

TABELA 13 – FORMULAÇÃO BÁSICA UTILIZADA NA FABRICAÇÃO DE EMBUTIDO CÁRNEO ADICIONADO DE CULTURAS PROBIÓTICAS

MATÉRIAS-PRIMAS	QUANTIDADE
Carne suína	60%
Carne bovina	20%
Toucinho	20%
INGREDIENTES *	
Sal (cloreto de sódio)	3,0%
Glicose	0,5%
Sacarose	0,5%
Alho em pó	0,3%
Pimenta branca	0,2%
Noz moscada	0,02%
Nitrito de sódio	150 ppm
Nitrato de sódio	50 ppm
Fixador (acelerador de cura)	1%
Cultura <i>starter</i> comercial TSPX (CHR HANSEN)	0,15%
Cultura probiótica	variável para cada experimento

* Quantidades relativas ao conteúdo total de matérias-primas.

Para a formulação dos embutidos, a quantidade de matérias-primas, cloreto de sódio, açúcares e condimentos baseou-se em formulações descritas por TERRA (1998) e TERRA; FRIES; TERRA (2004). Para a adição do fixador utilizou-se a dosagem recomendada pelo fabricante. A quantidade de cultura *starter* utilizada baseou-se no número de células viáveis presentes na cultura comercial liofilizada necessário para atingir na massa do embutido valor mínimo de 1×10^8 UFC/ g.

O preparo da massa iniciou-se pela moagem das matérias-primas cárneas em disco de aço inox de 5 mm para a carne bovina e em disco de 8 mm para a carne suína. A carne bovina deve ser moída em chapa mais fina, pois suas fibras apresentam maior espessura e resistência em comparação às fibras da carne suína. O toucinho congelado foi picado em cubos com tamanho de 0,5 cm. Procedeu-se a mistura manual das matérias-primas cárneas e de parte do cloreto de sódio para a obtenção de consistência pastosa e promoção de liga na massa, obtida pela extração completa das proteínas miofibrilares que respondem pela união dos fragmentos de carne no produto final. Posteriormente, foram adicionados à massa toucinho, pimenta branca, alho em pó, noz moscada, glicose, sacarose e o restante do cloreto de sódio. Os sais de cura, nitrito e nitrato de sódio e o fixador foram adicionados à massa previamente diluídos em água destilada para facilitar sua mistura, sendo o fixador adicionado em seguida aos sais de cura (TERRA, 1998; GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

A cultura *starter* composta de *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus* foi adicionada à massa em concentração celular superior a $3,2 \times 10^{10}$ UFC/ g de inóculo, ao final da mistura, após prévia ativação em água não clorada (16 a 30 mL de água conforme a quantidade de matéria-prima cárnea) por 30 minutos.

As culturas probióticas foram adicionadas à massa após a adição da cultura *starter*. Os procedimentos de preparo e adição das culturas probióticas às massas cárneas estão descritos em itens específicos contidos na metodologia de cada experimento.

O embutimento das massas foi realizado em embutideira manual (JAMAR) utilizando tripa artificial de colágeno reconstituído com calibre de 45 mm previamente embebida em solução de ácido láctico a 1% por 15 minutos para promover desinfecção e facilitar sua aderência à massa (NASSU; BESERRA; GONÇALVES, 2002; TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

Após o embutimento, os produtos foram identificados de acordo com o tratamento ao qual pertenciam e encaminhados à maturação em câmara de incubação B.O.D., adaptada às condições ambientais necessárias para seu processamento (Figura 5). As condições de temperatura, tempo de maturação e período de armazenamento dos embutidos sofreram variação em cada experimento e estão descritas na metodologia de cada experimento.

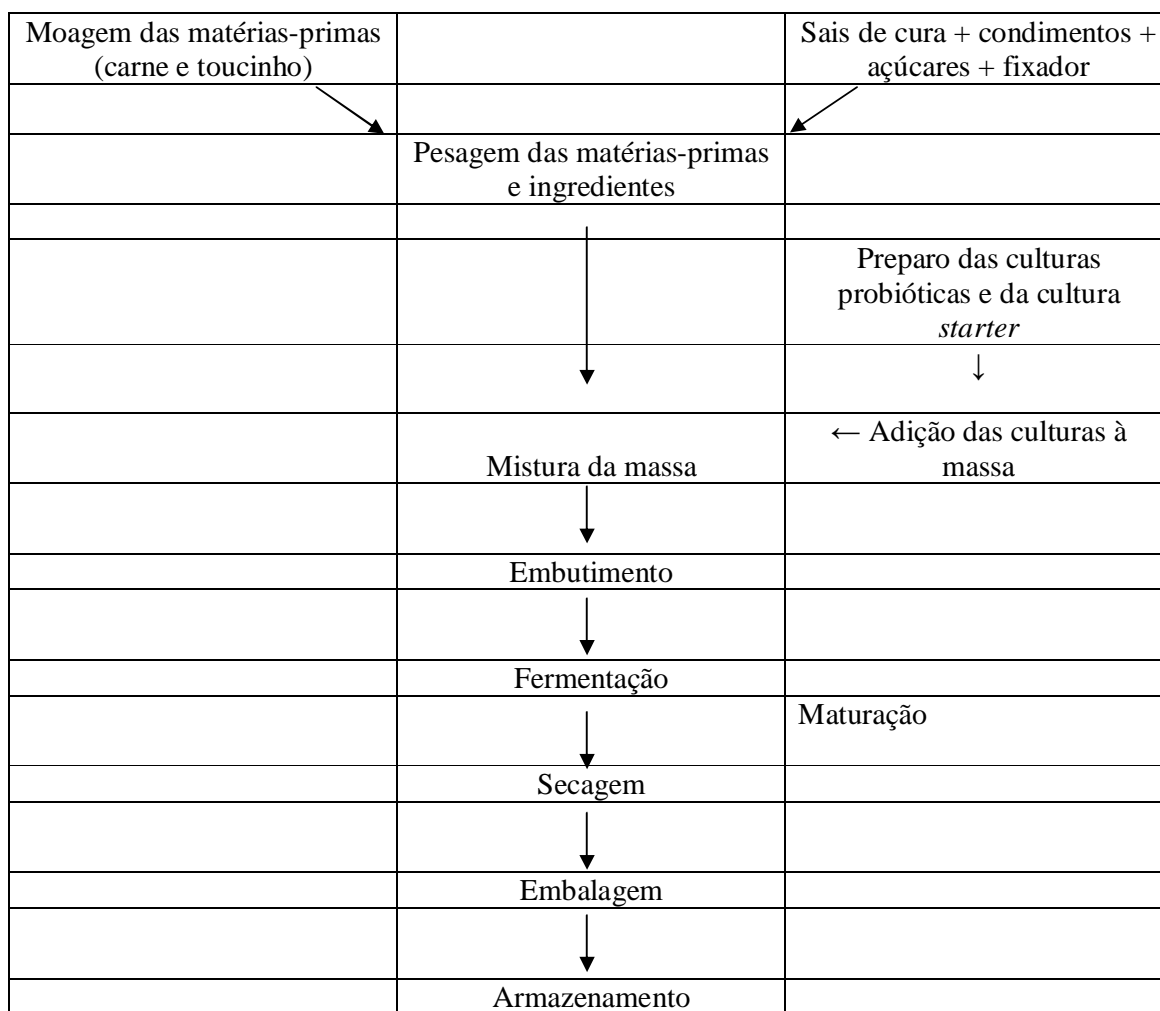
A regulação da umidade relativa do ar (UR) na câmara B. O. D. foi realizada com a utilização de recipiente contendo água ou sal comum no interior da câmara, haja vista que a câmara B.O. D não dispunha de aparato para regulação da umidade relativa do ar. A leitura da UR da câmara foi realizada pela utilização de higrôtermômetro digital portátil (FRANCE) localizado no interior da câmara (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000) (Figura 5).

FIGURA 5 – PEÇAS DE EMBUTIDOS CÁRNEOS ARMAZENADOS EM CÂMARA DE INCUBAÇÃO B.O.D. PARA INÍCIO DA FERMENTAÇÃO E SECAGEM



O fluxograma básico de produção de embutido cárneo fermentado com culturas probióticas está apresentado na Figura 6.

FIGURA 6 - FLUXOGRAMA BÁSICO DE PROCESSAMENTO DE PRODUTO CÁRNEO FERMENTADO ADICIONADO DE CULTURAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS



3.2.3.1 Experimento 1

No Experimento 1 foram realizados quatro tratamentos que variaram no tipo da cultura bacteriana adicionada ao embutido cárneo, buscando verificar o efeito das culturas probióticas sobre características físico-químicas e sensoriais do produto.

O Tratamento 1, denominado de tratamento controle, recebeu adição apenas da cultura *starter* comercial, enquanto que nos demais tratamentos os embutidos receberam além da adição da cultura *starter*, a adição de diferentes espécies de *Lactobacillus* potencialmente probióticos de acordo com a seguinte descrição:

- Tratamento 1 (controle): cultura *starter* TSPX contendo *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus*;
- Tratamento 2: cultura *starter* TSPX + cultura pura de *Lactobacillus casei*;
- Tratamento 3: cultura *starter* TSPX + cultura pura de *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus*;
- Tratamento 4: cultura *starter* TSPX + cultura pura de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*.

O preparo das culturas puras de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* e *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* utilizadas para inoculação da massa cárnea nos Tratamentos 2, 3 e 4 foi realizado de acordo com o procedimento a seguir.

a) Preparação dos inóculos de culturas probióticas

Considerando-se que o número de células viáveis das culturas bacterianas recomendado para adição à massa cárnea seja dois ciclos logarítmicos superior ao número de células da flora contaminante da carne e que o número máximo aceitável de microrganismos contaminantes na carne é de 10^6 UFC/ g (TERRA, 1998), a quantidade de culturas probióticas adicionada à massa dos embutidos deve ser de no mínimo 10^8 UFC/ g. Obedecendo a essa proporção e considerando a quantidade total de 3.000 g de massa cárnea utilizada para cada tratamento do Experimento 1, o número de células viáveis das culturas probióticas necessário para a inoculação da massa cárnea seria 3×10^{11} UFC. Para obter a referida quantidade de células viáveis de bactérias probióticas no inóculo tornou-se necessária a utilização do volume inicial de 1.000 mL de inóculo, haja vista que na contagem do número de células viáveis das cepas probióticas puras em caldo MRS obteve-se valor de 3×10^8 UFC/ mL. Devido ao grande volume de inóculo necessário, as células bacterianas foram concentradas por centrifugação previamente à inoculação na massa cárnea.

As cepas puras de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* foram pré-ativadas em 10 mL de caldo MRS com incubação a 37° C por 48 horas. Após a pré-ativação, alíquotas de 3 mL de cada cultura foram semeadas em 1.000 mL de caldo MRS com posterior incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após esse período, procedeu-se a centrifugação do volume total de caldo contendo as culturas ativadas em centrífuga refrigerada (EPPENDORF 5810 R) a 15°C com rotação de 3.500 rpm por 15 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado adicionado à massa dos embutidos. Do volume total de precipitado de cada cultura, tomou-se 2 mL para a contagem do número de células viáveis dos inóculos.

O volume de precipitado obtido para a cultura de *Lactobacillus casei* utilizado para a inoculação da massa no Tratamento 2 foi de 31 ml e a concentração celular obtida foi $7,5 \times 10^{10}$ UFC/ mL de inóculo. O volume de precipitado para a cultura de *L. casei ssp. rhamnosus* foi de 45 mL e o número de células viáveis $6,5 \times 10^{10}$ UFC/ mL (Tratamento 3), enquanto que o volume de inóculo de *L. paracasei* utilizado no Tratamento 4 foi de 43 mL contendo $7,5 \times 10^{10}$ UFC/ mL.

Os inóculos de culturas probióticas foram adicionados às massas cárneas dos Tratamentos 2, 3 e 4 ao final da mistura, após a adição de todos os demais ingredientes e da cultura *starter* comercial seguindo a formulação e o procedimento de elaboração dos embutidos anteriormente descritos.

b) Condições de temperatura e umidade relativa do ar na câmara de maturação

Para cada tratamento obteve-se em média 20 peças de embutido cárneo, com comprimento aproximado de 12 cm. Os embutidos foram maturados por 25 dias em câmara de incubação B.O.D. (FANEM, MDL 347 CD) com temperatura inicial de 25°C e umidade relativa do ar de 89%, as quais sofreram redução gradativa para permitir a secagem do produto (Tabela 14).

A temperatura inicial de fermentação dos embutidos influencia sua qualidade final. Temperaturas acima de 26° C podem ocasionar problemas relacionados à segurança microbiológica do produto, além de excessiva acidificação e fusão das gorduras (NASSU; BESERRA; GONÇALVES, 2002).

TABELA 14 - CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR UTILIZADAS NA CÂMARA DE INCUBAÇÃO DURANTE O PERÍODO DE MATURAÇÃO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS DO EXPERIMENTO 1

TEMPO DE MATURAÇÃO (DIAS)	TEMPERATURA (°C)	UMIDADE RELATIVA DO AR (%)
1	25	89
2	24	89
3	23	88
4	22	88
5	21	87
6	20	86
7	18	80
8	18	77
9	18	75
↓	↓	↓
25	18	75

c) Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais

As modificações físico-químicas e microbiológicas ocorridas nos embutidos durante a maturação foram avaliadas no 1º, 3º, 5º, 7º, 11º, 14º, 21º e 25º dias. As análises físico-químicas realizadas nas amostras coletadas para cada tratamento foram atividade de água, acidez titulável, umidade, pH, perda de peso e perda de diâmetro. Para verificar a viabilidade das culturas bacterianas adicionadas foi realizada a contagem de *Lactobacillus* para os Tratamentos 2, 3 e 4 e a contagem de *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus* para todos os tratamentos. A avaliação sensorial foi realizada para todos os tratamentos após 25 dias de maturação dos embutidos cárneos.

A metodologia utilizada para as determinações físico-químicas, análises microbiológicas e avaliação sensorial dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 do Experimento 1 está descrita no item 3.2.5

3.2.3.2 Experimento 2

Para o segundo experimento foram selecionadas duas espécies de culturas probióticas previamente testadas no Experimento 1 sendo realizados três tratamentos:

- Tratamento 1 - controle: cultura *starter* TSPX contendo *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus*;
- Tratamento 2: cultura *starter* TSPX + cultura pura de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*;
- Tratamento 3: cultura *starter* TSPX + cultura pura de *Lactobacillus casei*.

Os embutidos deste experimento foram elaborados seguindo a formulação básica e o fluxograma de produção conforme descritos anteriormente, porém com modificações quanto ao preparo dos inóculos de culturas probióticas, tempo e condições de temperatura e umidade relativa do ar durante a maturação e período de estocagem.

a) Preparação dos inóculos de culturas probióticas

Com o objetivo de reduzir o volume e aumentar a concentração celular dos inóculos das culturas probióticas, a centrifugação das culturas puras de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei*, ativadas em caldo MRS a 37° C por 48 horas, foi realizada em centrífuga refrigerada (EPPENDORF 5810 R) a 0° C com rotação de 12.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, a porção celular precipitada foi ressuspensa em 20 mL de solução salina estéril a 0,9% para inoculação na massa dos embutidos. A escolha da rotação e do tempo utilizados para a centrifugação das culturas probióticas foi baseada em estudos prévios que verificaram a eficiência da concentração do inóculo e a manutenção da viabilidade celular nessas condições. A concentração celular no inóculo usado no Tratamento 2 composto por *Lactobacillus paracasei* foi $1,4 \times 10^{10}$ UFC/ mL e a concentração celular de *L. casei* usada para a inoculação da massa no Tratamento 3 foi $4,5 \times 10^{10}$ UFC/ mL.

b) Condições de temperatura e umidade relativa do ar na câmara de maturação

Após o embutimento e identificação das peças de cada tratamento, os embutidos foram encaminhados à câmara de maturação (B. O. D. FANEM, MDL 347 CD) iniciando a fermentação em temperatura de 20° C e umidade relativa do ar de 90%, permanecendo por 28 dias.

A temperatura e a umidade relativa do ar no interior da câmara sofreram redução gradativa conforme mostra a Tabela 15. O controle da umidade relativa do ar (UR) na câmara B. O. D. foi realizado com a utilização de recipiente contendo água ou sal comum no interior da câmara e sua medida determinada em higrotermômetro digital portátil (FRANCE) localizado no interior da câmara.

TABELA 15 - CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR UTILIZADAS NA CÂMARA DE INCUBAÇÃO DURANTE O PERÍODO DE MATURAÇÃO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS DO EXPERIMENTO 2

TEMPO DE MATURAÇÃO (DIAS)	TEMPERATURA (°C)	UMIDADE RELATIVA DO AR (%)
1	20	90
2	20	90
3	20	88
4	20	88
5	19	87
6	19	86
7	18	80
8	18	77
9	18	75
↓	↓	↓
28	18	75
29	4	-

Ao término da maturação, após 28 dias, foi realizada a remoção da tripa e as peças foram embaladas a vácuo, utilizando máquina embaladora (SELOVAC CV 18), em sacos plásticos (CRYOVAC BB 300 FRM com estrutura EVA) multicamadas e barreira ao vapor d'água e ao oxigênio. As peças embaladas a vácuo foram mantidas sob refrigeração a 4° C até 84 dias, totalizando 56 dias de armazenamento refrigerado.

c) Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais

As amostras de embutido fermentado dos Tratamentos 1, 2 e 3 foram avaliadas nos dias 1, 3, 5, 7, 11, 14, 17, 21, 28, 42, 56, 70, e 84. As determinações físico-químicas realizadas nos referidos tempos de amostragem foram: pH, acidez titulável, atividade de água e umidade, sendo que estas duas últimas determinações não foram realizadas no tempo de amostragem de 70 dias. As análises microbiológicas consistiram de contagem de *Lactobacillus* para os Tratamentos 2 e 3 e contagem de *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus* para os Tratamentos 1, 2 e 3. A avaliação sensorial foi realizada nas amostras de todos os tratamentos ao término da maturação (28 dias) e ao término do período de armazenamento refrigerado (84 dias).

A metodologia utilizada para as determinações físico-químicas, análises microbiológicas e avaliação sensorial dos Tratamentos 1, 2 e 3 do Experimento 2 está descrita no item 3.2.5.

3.2.3.3 Experimento 3

Considerando os resultados obtidos nos experimentos anteriores com relação à viabilidade da cultura probiótica e características físico-químicas e sensoriais dos embutidos cárneos, buscou-se a realização de um novo experimento com quatro tratamentos que variaram de acordo com o tipo de cultura bacteriana utilizada e com a adição de extrato vegetal com propriedade antioxidante aos embutidos conforme mostrado a seguir:

- Tratamento 1 - controle: cultura *starter* TSPX contendo *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus*;
- Tratamento 2: cultura *starter* TSPX contendo *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus* + extrato hidroetanólico de marcela do campo (*Achryrocline satureioides* (Lam). DC.);
- Tratamento 3: cultura *starter* TSPX + cultura pura de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*;
- Tratamento 4: cultura *starter* TSPX + cultura pura de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* + extrato hidroetanólico de marcela do campo (*Achryrocline satureioides* (Lam). DC.).

O extrato hidroetanólico de marcela do campo (*Achyrocline satureioides* (Lam). DC.) foi elaborado mediante a homogeneização da planta com solvente composto por etanol 96° GL e água destilada na proporção de 8:2 permanecendo na solução por 1 hora à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado e a porção sólida submetida a duas extrações consecutivas com posterior evaporação do material filtrado em evaporador rotatório até a obtenção do extrato hidroetanólico com proporção de líquido: sólido de 8:2. O extrato hidroetanólico de marcela do campo foi fornecido pelo Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria.

A formulação e o procedimento de elaboração dos embutidos foram realizados conforme descrito no item 3.2.3. O extrato hidroetanólico de marcela do campo utilizado nos Tratamentos 2 e 4 foi adicionado ao toucinho picado na proporção de 0,5%, previamente à mistura deste com os demais ingredientes da formulação.

a) Preparação dos inóculos de culturas probióticas

Os inóculos de *Lactobacillus paracasei* foram preparados de acordo com a técnica de descrita no Experimento 2. Os Tratamentos 3 e 4 receberam a adição de 20 mL de inóculo, contendo número de células viáveis de $6,9 \times 10^{10}$ UFC/ mL ao final do preparo da massa, após a adição da cultura *starter*.

b) Condições de temperatura e umidade relativa do ar na câmara de maturação

As condições de temperatura e umidade relativa do ar empregadas na câmara de maturação foram as mesmas utilizadas no Experimento 2, onde os embutidos permaneceram por 28 dias. Após o término do período de maturação, os embutidos foram embalados a vácuo conforme descrito anteriormente e armazenados sob refrigeração a 4° C por um período de 150 dias totalizando um tempo de estudo de 178 dias.

c) Análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais

A evolução da maturação e a estabilidade dos embutidos durante o armazenamento foi acompanhada mediante as determinações de atividade de água, pH, umidade, perda de peso e perda de diâmetro. A atividade de água e a umidade dos embutidos foram determinadas nos tempos 1, 3, 5, 7, 11, 14, 28, 37, 50, 63, 78, 133 e 178 dias, enquanto que a determinação de pH foi realizada nos tempos 1, 3, 5, 7, 11, 14, 21, 28, 37, 50, 63, 78, 133 e 178 dias. As perdas de peso e de diâmetro dos embutidos foram efetuadas nos tempos 1, 3, 5, 7, 11, 14, 21 e 28 dias. A determinação da oxidação lipídica expressa pelos valores do ácido 2-tiobarbitúrico e a determinação instrumental da cor dos embutidos foram realizadas nos tempos 1, 28, 50, 78, 133 e 178 dias e os teores de proteínas e lipídeos foram determinados nos tempos 1, 28 e 178 dias.

O desenvolvimento das culturas bacterianas e a qualidade microbiológica dos embutidos foram determinados pela contagem de *Lactobacillus*, contagem de *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus* e contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*. A enumeração dos *Lactobacillus* e da cultura *starter* foi realizada nos embutidos nos tempos 1, 3, 5, 7, 11, 14, 21, 28, 37, 50, 63, 78, 133 e 178 dias e a contagem de coliformes e *E. coli* foi realizada nos tempos 1, 28 e 178 dias.

Os embutidos foram avaliados sensorialmente por provadores semi-treinados nos tempos 28, 78, 133 e 178 dias.

A metodologia utilizada para as determinações físico-químicas, análises microbiológicas e avaliação sensorial dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 do Experimento 3 está descrita no item 3.2.5.

3.2.4 Resistência de *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* ao Baixo pH e na Presença de Sais Biliares

Entre os critérios utilizados para a verificação das características funcionais dos probióticos estão a tolerância da cultura probiótica à acidez gástrica e à toxicidade da bile (ANNUK, et al., 2003; PENNACCHIA et al., 2004).

Para verificar a resistência da cultura de *L. paracasei* em baixos valores de pH e na presença de sais biliares foram realizados testes submetendo a cultura bacteriana a condições similares às encontradas no trato gastrointestinal, buscando simular as condições de digestão *in vitro*.

3.2.4.1 Capacidade de resistência ao baixo pH

O efeito do baixo pH sobre a viabilidade de *L. paracasei* foi verificada mediante adaptação da técnica descrita por ERKKILÄ; PETAJA (2000) que consiste na inoculação de 1 mL da cultura ativada em caldo MRS a 37° C por 48 horas, em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril com pH ajustado para os valores 3, 4, e 5 pelo emprego de solução de ácido clorídrico a 8 M. A solução salina foi preparada pela dissolução de 9 g/ L de cloreto de sódio (NaCl), 9 g/ L de fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) e 1,5 g/ L de fosfato de potássio (KH_2PO_4) em água destilada, com posterior esterilização em autoclave a 121° C por 15 minutos. Os tubos de ensaio foram incubados em estufa bacteriológica a 37° C e a contagem do número de células viáveis de *L. paracasei* foi realizada após a exposição da cepa à solução salina ácida pelo período de 0, 1, 2,5 e 4 horas. A contagem das células viáveis de *L. paracasei* foi efetuada em placas de Petri contendo ágar MRS, mediante semeadura em profundidade, incubadas a 37° C por 48 horas e o resultado expresso em UFC/ mL. O crescimento bacteriano observado em solução salina com pH 5,0 foi utilizado como controle para a comparação dos resultados.

3.2.4.2 Capacidade de resistência aos sais biliares

A resistência de *L. paracasei* aos sais biliares foi verificada pela inoculação de 1 mL da cepa pré-ativada em 9 mL de caldo MRS (pH 5,6) adicionado de 0%, 0,15% e 0,30% de sais biliares (SIGMA). Os tubos foram incubados a 37° C e a enumeração de *L. paracasei* realizada após 0, 1, 2,5 e 4 horas de exposição ao caldo em ágar MRS a 37° C por 48 horas (ERKKILÄ; PETAJA; 2000).

3.2.5 Métodos de Análise

3.2.5.1 Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados por processo eletrométrico em potenciômetro digital com sonda de perfuração devidamente calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0 mediante leituras diretas nos embutidos, evitando-se o contato da sonda com a gordura das amostras (TERRA; BRUM, 1988).

3.2.5.2 Determinação de acidez titulável

O teor de ácidos livres nos embutidos fermentados foi determinado pelo método titulométrico com solução de hidróxido de sódio 0,1 N (TERRA; BRUM, 1988).

3.2.5.3 Determinação da atividade de água

A atividade de água dos embutidos foi verificada utilizando aparelho medidor de atividade de água (AQUALAB CX-2) por medida direta nas amostras previamente trituradas e mantidas à temperatura ambiente de 21° C.

3.2.5.4 Determinação da umidade

A umidade dos embutidos fermentados foi determinada pelo método gravimétrico com dessecação em estufa a 105° C conforme metodologia descrita pela AOAC (2000).

3.2.5.5 Determinação do teor de gordura

O teor de gordura foi determinado pelo método butirométrico de Gerber, utilizado para amostras de leite. O método fundamenta-se no ataque seletivo da matéria orgânica, com exceção da gordura, pelo ácido sulfúrico. A porção lipídica é separada por centrifugação com o auxílio de álcool amílico que modifica a tensão superficial da gordura, sendo então medida no lactobutirômetro de Gerber (CAMPOS, 2002).

3.2.5.6 Determinação de proteína

A determinação do teor de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl que se baseia na determinação do nitrogênio total da amostra conforme metodologia da AOAC (2000).

3.2.5.7 Determinação da perda de peso

A perda de peso dos embutidos durante a maturação e secagem foi determinada pelo método gravimétrico mediante a pesagem de duas peças de embutido de cada tratamento antes da maturação e após cada tempo de amostragem até o momento do envase a vácuo. Os resultados foram expressos em porcentagem de perda de peso.

3.2.5.8 Determinação da redução de diâmetro

O diâmetro de duas peças de embutido cada tratamento foi medido com uso de régua graduada antes da maturação e após cada tempo de amostragem até o final da secagem, expressando-se os resultados em porcentagem de redução de diâmetro.

3.2.5.9 Determinação da oxidação lipídica

A oxidação lipídica foi verificada pela reação com TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) de acordo com a metodologia descrita por TARLADGIS; PEARSON; DUCAN JR (1964), modificada por CRACKER et al. (1988). A reação das amostras com TBA, que produz coloração vermelha, foi medida espectrofotometricamente a 530 nm e os resultados foram expressos em mg de aldeído malônico/ kg de amostra.

Entre os aldeídos formados na oxidação lipídica encontram-se o heptanal, pentanal e hexanal. Porém, o produto de oxidação lipídica mais comumente citado é o malonaldeído, produzido durante a autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados, que pode ser identificado pela reação com TBA (BORGO; ARAÚJO, 2005).

Para a realização da análise, as amostras de embutidos receberam a adição de sulfanilamida conforme recomendado por SHAHIDI et al. (1985) para amostras que contêm nitrito.

3.2.5.10 Determinação da cor

A cor das amostras de embutidos foi determinada com o auxílio de um colorímetro portátil (HUNTERLAB MINISCAN XE PLUS), utilizando-se a escala L*, a*, b* do sistema CIELab com fonte de luz D 65 e abertura da célula de medida de 30 mm. As peças de embutido foram cortadas no sentido transversal e as medidas realizadas em número de cinco para cada peça diretamente sobre sua superfície. Os valores L*, a* e b* correspondem ao brilho, índice de cor vermelha e índice de cor amarela, respectivamente, sendo caracterizados como o resultado do reflexo de fontes de luz específicas na superfície do embutido transformado em coordenadas de cores (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

3.2.5.11 Determinações microbiológicas

a) Preparo das amostras

O procedimento de preparo das amostras de embutidos para as contagens microbiológicas foram realizados conforme a metodologia descrita por BRASIL (2003b), recomendada para controle de produtos de origem animal e água. Seguindo os procedimentos, as amostras foram diluídas em água peptonada a 0,1%, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e homogeneizadas em homogeneizador *stomacher* por 60 segundos, executando-se diluições subseqüentes até a concentração desejada.

b) Contagem de *Pediococcus pentosaceus*

A contagem de *Pediococcus pentosaceus*, bactéria láctica da cultura *starter* adicionada aos embutidos, foi realizada pela semeadura em profundidade das amostras homogeneizadas e diluídas em água peptonada estéril a 0,1% até a concentração desejada em placas de Petri com ágar MRS adicionado de 10 mg de tetraciclina (SIGMA Chemical Co) por litro do meio para inibição do crescimento de *Lactobacillus*.

Após a semeadura, as placas invertidas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 48 horas e o resultado da contagem expresso em UFC/ g de amostra (SWANSON et al., 1992; SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

c) Contagem de *Lactobacillus*

A contagem dos *Lactobacillus* adicionados como culturas probióticas aos embutidos fermentados foi realizada em ágar MRS (De MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960; CARR; CHILL; MAIDA, 2002) com incubação a 37° C por 48 horas. Essas condições de composição do meio de cultura e incubação permitem o crescimento concomitante de *Lactobacillus* e de *Pediococcus* da cultura *starter*. Dessa forma, o resultado da contagem de *Lactobacillus* foi calculado como a diferença entre a contagem total de bactérias lácticas em ágar MRS puro e a contagem de *Pediococcus* em ágar MRS adicionado de 10 mg/ L de tetraciclina.

d) Contagem de *Staphylococcus xylosus*

A contagem de *Staphylococcus xylosus*, bactéria integrante da cultura *starter*, foi realizada pela semeadura das diluições decimais das amostras em placas de Petri com ágar Baird Parker incubadas a 37° C por 48 horas e o resultado expresso em UFC/ g (ERKKILÄ et al., 2001a; ERKKILÄ et al., 2001b).

e) Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

Como indicativo das condições higiênico-sanitárias de processamento dos embutidos e da ação inibitória das culturas bacterianas adicionadas aos embutidos sobre a flora contaminante foram realizadas a contagem de coliformes totais e a contagem de *Escherichia coli*.

As contagens foram executadas pelo método Petrifilm Coliformes (AOAC 991.14) em placas Petrifilm (3M) com incubação a 37°C por 48 horas, onde as colônias de coliformes totais mostram-se vermelhas associadas a bolhas de gás e as colônias de *Escherichia coli* mostram-se azuis ou vermelho azuladas com bolhas de gás. A principal vantagem das placas de Petrifilm em relação aos métodos convencionais é a sua conveniência, pois estão prontas para uso, eliminando as etapas de preparação dos meios de cultura e vidrarias necessários, ocupam menos espaço em incubadoras, geladeiras, armários, autoclaves, têm descarte mais fácil, não quebram, não derramam, podem ser congeladas para contagem posterior ou reanálise (SANT'ANA; CONCEIÇÃO; AZEREDO, 2002).

A opção pela contagem de *Escherichia coli* como indicador de contaminação fecal e não pela contagem de coliformes termotolerantes baseou-se no fato de que a contagem específica de *Escherichia coli* permite determinação mais exata da incidência de contaminação fecal (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

3.2.5.12 Avaliação sensorial

A avaliação sensorial foi realizada após o período de maturação e durante o armazenamento dos embutidos em todos os tratamentos dos Experimentos 1, 2 e 3.

As amostras foram preparadas mediante o corte transversal das peças de embutidos em forma de fatias finas com espessura média de três milímetros, descartando-se as extremidades. As amostras de cada tratamento foram apresentadas a uma equipe de 18 provadores semi-treinados, habituados ao consumo de embutidos fermentados, distribuídas em pratos de polietileno codificados aleatoriamente com números de três dígitos.

As características avaliadas foram cor, sabor, aroma, textura, gosto ácido e aspecto, utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos onde a pontuação 1 correspondia à denominação ruim, fraco ou suave, a pontuação 5 à denominação indiferente e a pontuação 9 à denominação bom, forte ou firme dependendo do atributo avaliado. O modelo de ficha utilizado para a avaliação sensorial está apresentado no ANEXO 1.

Os valores obtidos nas amostras para cada característica avaliada foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias, utilizando nível de significância de 5% (MORAES, 1990; CHAVES; SPROESSER, 1993; DUTCOSKI, 1996).

3.2.5.13 Análise estatística

Os valores obtidos nas análises realizadas nos embutidos fermentados dos Experimentos 1, 2 e 3 foram submetidos ao cálculo de média, desvio padrão e análise de variância, utilizando função específica do programa Excel da Microsoft Corporation e ao teste de Tukey para a comparação de médias com significância no nível de 5% (GOMES, 1990).

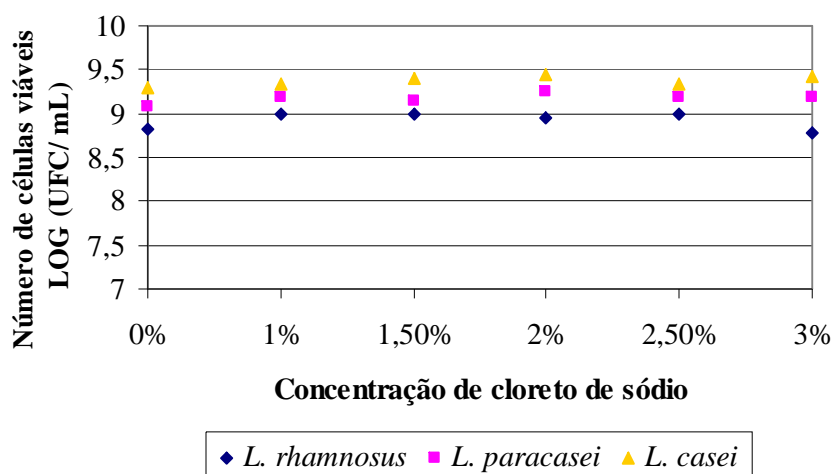
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SENSIBILIDADE DAS CULTURAS PROBIÓTICAS AOS SAIS DE CURA

O desenvolvimento de probióticos para produtos cárneos fermentados pressupõe o uso de bactérias probióticas resistentes ao nitrito e ao cloreto de sódio, capazes de crescer rapidamente durante a fermentação. Também devem apresentar resistência à acidez, à lisozima e à bile, mostrando capacidade para colonizar o trato intestinal humano mediante mecanismos de aderência ou ligação às células intestinais (PAPAMANOLI et al., 2003).

O número de células viáveis dos lactobacilos testados nas diferentes concentrações de cloreto de sódio está apresentado na Figura 7.

FIGURA 7 - CRESCIMENTO DAS CEPAS DE LACTOBACILOS TESTADOS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO (NaCl)



De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que nas contagens realizadas em ágar MRS com adição de 1% a 3% de cloreto de sódio, todas as culturas de *Lactobacillus* testadas apresentaram elevado número de células viáveis quando comparadas ao controle (sem adição de cloreto de sódio).

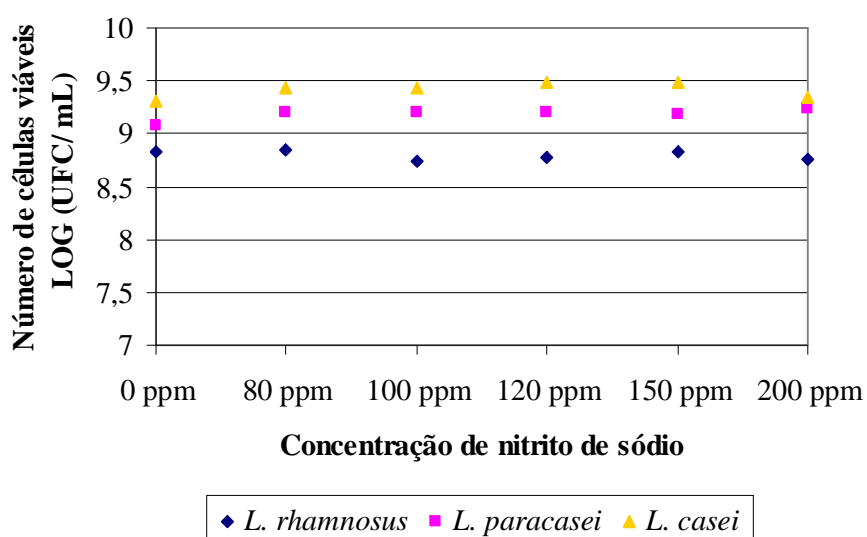
As culturas de *L. casei* e *L. paracasei* apresentaram maior número de células viáveis nas concentrações de 1% a 3% de cloreto de sódio em relação ao teste controle, enquanto que *L. rhamnosus* mostrou contagem superior à do controle para as concentrações de 1% a 2,5% de cloreto de sódio.

A menor contagem observada foi para o *Lactobacillus rhamnosus* em meio contendo 3% de NaCl com número de células de $5,9 \times 10^8$, partindo-se de número no teste controle de $6,6 \times 10^8$ e a maior contagem foi obtida pelo *Lactobacillus casei*, com número de células de $2,8 \times 10^9$ em meio contendo 2% de NaCl, enquanto que no teste controle obteve-se $2,0 \times 10^9$ UFC/ mL.

Os lactobacilos apresentaram resistência aos níveis de cloreto de sódio testados, mostrando possibilidade de sua utilização em produtos cárneos fermentados, para os quais recomenda-se a adição de 3% de NaCl no intuito de assegurar proteção contra microrganismos indesejáveis (SAMESHIMA et al., 1998).

A adição de nitrito de sódio ao meio de cultura até a concentração de 200 ppm também se mostrou suportável pelas culturas probióticas testadas, não afetando seu crescimento em relação ao meio de cultura puro (Figura 8).

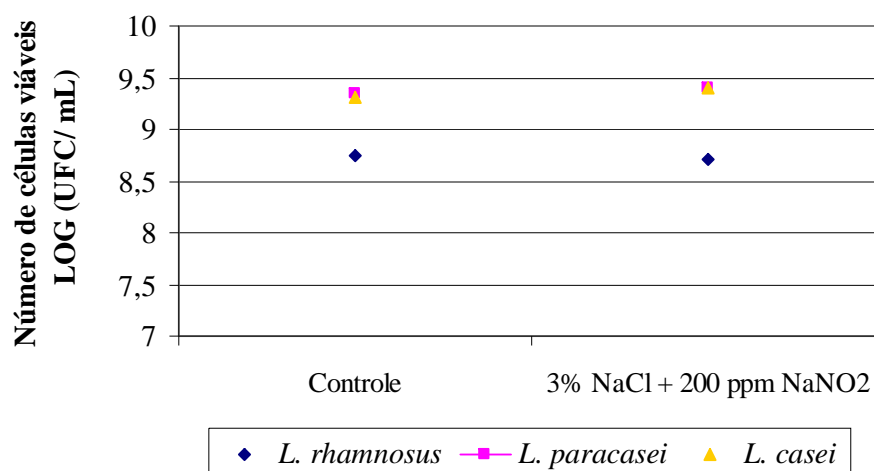
FIGURA 8 - CRESCIMENTO DAS CEPAS DE LACTOBACILOS TESTADOS EM ÁGAR MRS SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRITO DE SÓDIO (NaNO_2)



As bactérias lácticas apresentaram elevada viabilidade nas diferentes concentrações de nitrito de sódio, obtendo contagens de $5,7 \times 10^8$ UFC/ mL, $1,7 \times 10^9$ UFC/ mL e $2,2 \times 10^9$ UFC/ mL na presença de 200 ppm de NaNO_2 , para *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e *L. casei*, respectivamente.

O número de células viáveis das bactérias lácticas obtido com o uso concomitante de cloreto de sódio e nitrito de sódio está apresentado na Figura 9.

FIGURA 9 - CRESCIMENTO DAS CEPAS DE LACTOBACILOS TESTADOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM 3% DE CLORETO DE SÓDIO (NaCl) E 200 ppm DE NITRITO DE SÓDIO (NaNO_2)



O uso conjunto de 3% de cloreto de sódio e 200 ppm de nitrito de sódio não interferiu negativamente no crescimento das culturas de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei*. As contagens dos *Lactobacillus* na presença dos sais de cura mostraram que a cultura de *L. rhamnosus* manteve seu crescimento estável, enquanto que as culturas de *L. paracasei* e *L. casei* apresentaram número de células viáveis superior ao encontrado no teste controle. Estima-se que os alimentos com alegação de propriedade probiótica devam conter número mínimo de células viáveis de bactérias lácticas de 10^6 UFC/ g, para a obtenção de efeitos benéficos e colonização do intestino (LÜCKE, 2000; FERREIRA, 2003; THARMARAJ; SHAH, 2003). Nesse sentido, os *Lactobacillus* testados mostraram número de células viáveis superior ao recomendado para a obtenção do efeito probiótico na presença concomitante de cloreto de sódio e de nitrito de sódio.

Segundo ARIHARA; ITOH (2000), os produtos cárneos no Japão devem receber a adição de 3% de cloreto de sódio e 200 ppm de nitrito de sódio para a manutenção da segurança microbiológica. Dessa forma, o uso de culturas resistentes aos sais de cura é a primeira condição para a produção de embutidos cárneos com propriedade probiótica (PAMANOLI et al., 2003). As espécies de *Lactobacillus* utilizadas neste trabalho mostraram resistência ao uso simultâneo de cloreto e de nitrito de sódio nas concentrações de 3% e 200 ppm, respectivamente.

SAMESHIMA et al. (1998) testaram a resistência de 202 espécies de lactobacilos de origem intestinal frente ao nitrito de sódio e ao cloreto de sódio, adicionados em meio líquido, e observaram que as cepas de *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* apresentaram-se tolerantes a esses sais.

4.2 SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS FRENTE AOS DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

Sabendo-se que o efeito probiótico somente é promovido pela ingestão de células viáveis de bactérias benéficas, um importante parâmetro para o monitoramento de sua viabilidade nos alimentos constitui-se na contagem diferenciada desses microrganismos mediante um método de enumeração seletiva. O teste de suscetibilidade microbiana aos antibióticos pode ser utilizado como ferramenta para o desenvolvimento de meios de culturas seletivos (CARR, CHILL; MAIDA, 2002; THARMARAJ; SHAH, 2003).

Entre os antimicrobianos testados, somente três mostraram grau de ação inibitória diferenciada para as bactérias lácticas utilizadas. A rifampicina inibiu o crescimento de todas as cepas testadas com exceção do *Lactobacillus casei* que revelou halo de inibição na zona limite de resistência a esse antimicrobiano. Todas as cepas testadas mostraram resistência à vancomicina conforme estudos descritos por ERKKILÄ et al. (2001a). Resultados semelhantes foram obtidos por THARMARAJ; SHAH (2003) em ágar MRS adicionado de 1 mg/L de vancomicina, no qual *L. casei* e *L. rhamnosus* apresentaram crescimento. De acordo com CARR, CHILL; MAIDA (2002) as bactérias lácticas dos gêneros *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e alguns *Lactobacillus* mostram-se resistentes à vancomicina na concentração de 30 µg em teste de disco difusão.

Por sua vez, a ampicilina e a tetraciclina mostraram eficiência na inibição das cepas de *Lactobacillus*, enquanto o *pediococo* apresentou-se resistente à ampicilina e pouco sensível à tetraciclina (Tabela 16).

TABELA 16 - RESULTADOS OBTIDOS NO TESTE DE SUSCETIBILIDADE DAS CULTURAS LÁCTICAS AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO

ANTIMICROBIANOS	PADRÃO INTERPRETATIVO (zonas de inibição em mm) *		ZONAS DE INIBIÇÃO UTILIZANDO BACTÉRIAS LÁCTICAS (MM)			
	Resistente	Suscetível	<i>Pediococcus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i>
Amoxicilina+ácido clavulânico	<19	>20	24	24	25	23
Ampicilina	<19	>20	19	25	26	22
Bacitracina	<08	>13	4	7	6	0
Cefalexina	<14	>18	23	20	22	18
Cefalotina	<14	>18	23	24	24	22
Ciprofloxacina	<15	>21	2	11	16	6
Clorafenicol	<12	>18	24	26	24	22
Eritromicina	<13	>18	22	28	26	31
Estreptomicina	<11	>15	2	8	2	10
Gentamicina	<12	>15	8	10	10	8
Imipenem	<13	>16	27	24	28	24
Kanamicina	<13	>18	2	9	0	0
Neomicina	<12	>17	11	12	8	11
Norfloxacina	<12	>17	2	8	10	12
Oxacilina	<09	>14	2	10	10	0
Penicilina G.	<20	>29	23	25	28	25
Rifampicina	<24	>25	25	24	28	28
Sulfonamida	<12	>17	2	6	0	5
Tetraciclina	<14	>19	16	30	26	28
Vancomicina	<09	>12	2	2	0	0

* LABORCLIN, 2003.

CARR, CHILL; MAIDA (2002) descrevem que a adição de 5 mg/L de ampicilina ao ágar MRS permite o crescimento seletivo de *Pediococcus pentosaceus*. Verificou-se que a enumeração isolada de *Pediococcus* poderia ser realizada com a adição de ampicilina ou tetraciclina ao meio de cultura. Devido ao menor custo e à maior facilidade para obtenção de tetraciclina no mercado brasileiro, esse antimicrobiano foi selecionado para as contagens

diferenciais das bactérias lácticas utilizando-se concentração de 10 mg de tetraciclina/ L de meio de cultura.

O número de células viáveis de *Pediococcus* e de *Lactobacillus* em ágar MRS com e sem a adição de tetraciclina está apresentado na Tabela 17.

TABELA 17 - CONTAGEM DE *PEDIOCOCCUS* E *LACTOBACILLUS* EM MEIO DE CULTURA COM E SEM A ADIÇÃO DE TETRACICLINA (10 MG/ L)

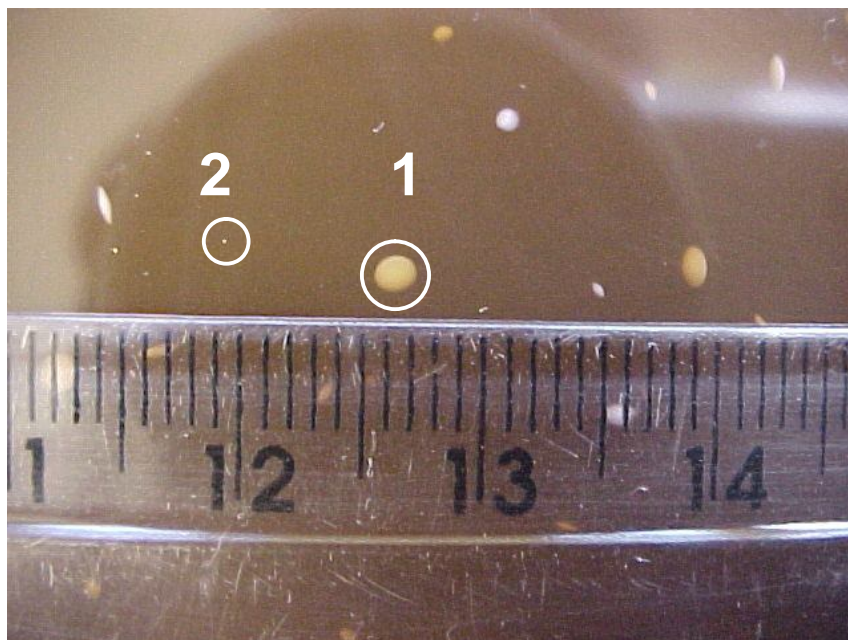
MEIO DE CULTURA ÁGAR MRS	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. rhamnosus</i>
Sem adição de tetraciclina	$2,50 \times 10^8$	$1,48 \times 10^9$	$1,43 \times 10^9$	$9,35 \times 10^8$
Com adição de 10 mg/ L de tetraciclina	$1,37 \times 10^8$	sc	sc	sc

sc - sem crescimento.

Os resultados obtidos confirmaram a ação inibitória da concentração de 10 mg/ L de tetraciclina sobre os lactobacilos testados, mostrando sua eficiência e viabilidade na contagem seletiva e isolada de *Pediococcus pentosaceus* em ágar MRS para produtos cárneos fermentados contendo esses microrganismos. Nesse sentido, a contagem dos lactobacilos probióticos é expressa como a diferença entre a contagem total de bactérias lácticas em ágar MRS sem adição de tetraciclina e a contagem de *Pediococcus* em ágar MRS adicionado de 10 mg/ L de tetraciclina.

Testou-se também a eficiência da tetraciclina em menor concentração no meio de cultura. Na concentração de 5 mg/L de ágar verificou-se crescimento das cepas puras de *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, juntamente com o crescimento de *Pediococcus pentosaceus*. Contudo, as colônias dos *Lactobacillus* apresentaram diâmetro muito reduzido quando comparado ao seu diâmetro em ágar MRS puro. Além disso, as colônias de *Pediococcus pentosaceus* mostravam coloração branca, superfície brilhante e suave com diâmetro aproximado de 2 mm (Figura 10).

FIGURA 10 - COLÔNIAS DE *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* (1) E DE *LACTOBACILLUS CASEI* (2) EM ÁGAR MRS ADICIONADO DE 5 MG/ L DE TETRACICLINA



4.3 EXPERIMENTO 1

O intuito do Experimento 1 foi verificar a influência da adição das espécies probióticas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* sobre as características físico-químicas e sensoriais do embutido fermentado, bem como seu desenvolvimento e viabilidade em produto cárneo.

4.3.1 Determinações Físico-Químicas

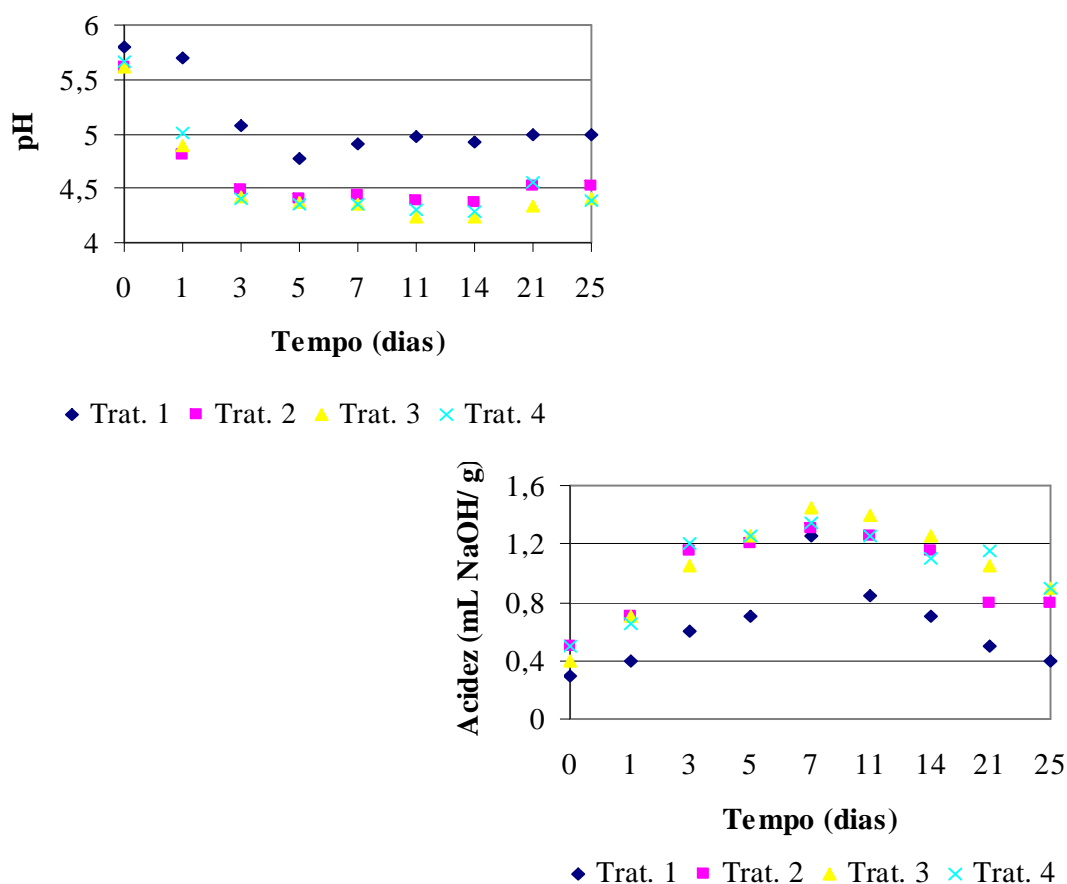
4.3.1.1 Determinações de pH e acidez

Durante as diferentes fases do processamento dos embutidos fermentados, três grandes grupos de substâncias presentes influenciam os valores de pH: os ácidos orgânicos oriundos da fermentação dos açúcares, os compostos básicos resultantes da proteólise gerada pelos

microrganismos ou pelas próprias enzimas tissulares e os ácidos orgânicos procedentes das gorduras (CHAGAS, 1998).

A evolução do pH e da acidez nos embutidos fermentados durante o período de maturação e secagem está apresentada na Figura 11.

FIGURA 11 – VARIAÇÕES DE pH E ACIDEZ DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS ADICIONADOS DE CULTURAS PROBIÓTICAS DURANTE 25 DIAS DE MATURAÇÃO E SECAGEM – EXPERIMENTO 1



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *Lactobacillus casei* + *starter*; Tratamento 3: *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* + *starter*; Tratamento 4: *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* + *starter*

Verificou-se que os embutidos pertencentes aos Tratamentos 2, 3 e 4, que receberam a adição de culturas probióticas, mostraram menores valores de pH e maiores valores de acidez em relação ao tratamento controle durante 25 dias de processamento, havendo diferença

estatística significativa no nível de 5% para os valores de pH entre o tratamento controle e os demais tratamentos. Para a acidez não foi verificada diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$).

O pH inicial (tempo 0) observado para os embutidos dos Tratamentos 2, 3 e 4 foi ligeiramente inferior ao do tratamento controle em decorrência da acidez do caldo utilizado como inóculo das culturas probióticas.

SAMESHIMA et al. (1998) estudaram a queda do pH em salames adicionados de *L. rhamnosus* e *L. paracasei ssp. paracasei* e verificaram que após 24 horas de fermentação, o pH dos embutidos situou-se entre 5,0 e 5,2. Esses valores mostram-se semelhantes ao valor de 5,01 encontrado para o Tratamento 4 (adicionado de *Lactobacillus paracasei*) e ligeiramente superior ao valor de 4,89 encontrado para o Tratamento 3 (adicionado de *L. rhamnosus*).

Nos primeiros três dias de maturação verificou-se rápida queda do pH dos embutidos com valores que variaram entre 5,08 e 4,40. Os embutidos adicionados de *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei* mostraram valores de pH de 4,48, 4,42 e 4,40 no terceiro dia de fermentação, respectivamente, apresentando resultados próximos ao valor de pH 4,4 encontrado por SAMESHIMA et al. (1998) em salames adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* para o mesmo período de maturação.

Os referidos autores também verificaram que esses baixos valores de pH produzidos pelas culturas de *L. rhamnosus* e *L. paracasei* foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* nos salames.

A queda do pH nos embutidos fermentados para valores próximos a 5,0 nos primeiros dias de fermentação torna o ambiente protegido contra a ação de bactérias gram negativas indesejáveis; constituindo a base para sua segurança microbiológica (LÜCKE, 2000; ERKKILÄ et al., 2001b; TYÖPPÖNEN et al., 2003).

A redução do pH do salame para níveis próximos a 5,0 objetiva alcançar o ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares da carne, provocando perda de água e obtenção de textura no produto (CAMPOS, 2002).

A partir do sétimo dia de fabricação, o pH observado no tratamento controle sofreu ligeiro aumento, mantendo-se próximo a 5,0 até o final da maturação e secagem, enquanto que os valores de pH dos embutidos com culturas probióticas sofreram pequenas oscilações ao longo dos 25 dias de processamento, variando entre 4,55 e 4,24. De acordo com TERRA; FRIES; TERRA (2004), a partir do sétimo dia de fabricação, os valores de pH sofrem aumento devido às reações de descarboxilação e desaminação de aminoácidos, que liberam

amônia no meio, alcalinizando-o. Porém, o pH pode sofrer nova redução devido à lipólise que libera ácidos graxos livres no meio.

ERKILLÄ et al. (2001a) observaram que no sétimo dia de maturação de salames fermentados com três diferentes cepas de *L. rhamnosus*, sem o uso de cultura *starter*, os valores de pH variaram entre 4,9 e 5,1, situando-se acima do pH obtido para o Tratamento 3 (*starter* + *L. rhamnosus*). O valor de pH obtido no Tratamento 3 foi menor em decorrência da presença de *Pediococcus pentosaceus* presente na cultura *starter* utilizada, que por tratar-se de bactéria láctica, produz ácido láctico no meio e conseqüentemente, provoca a queda de pH.

Os embutidos pertencentes aos quatro tratamentos mostraram aumento da acidez até o sétimo dia de fermentação. A partir do décimo primeiro dia, observou-se redução gradativa da acidez, que assim permaneceu até o final da fabricação, coincidindo com o ligeiro aumento de pH observado para o mesmo período.

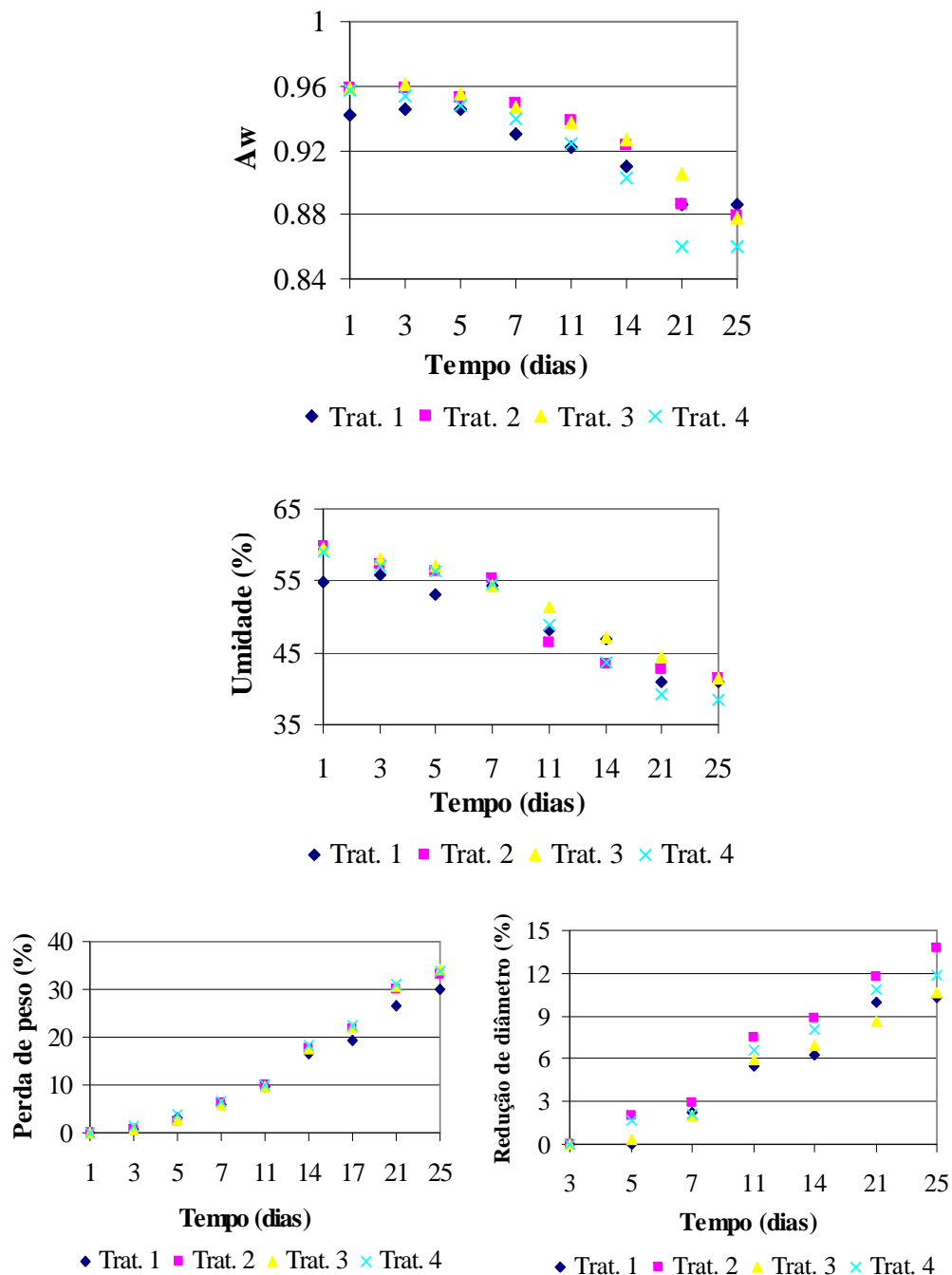
Ao final do processamento, o embutido controle obteve pH próximo a 5,0 e acidez de 0,4 mL de NaOH/ 100 g, ao passo que nos tratamentos com culturas probióticas os valores de pH ficaram próximos a 4,5 e de acidez entre 0,8 e 0,9 mL de NaOH/ 100 g, demonstrando atividade fermentativa das culturas probióticas sobre os açúcares do meio.

4.3.1.2 Determinações de atividade de água, umidade, perda de peso e redução de diâmetro

A porcentagem de umidade e a atividade de água (A_w) são determinações utilizadas para medir o teor de água nos alimentos e estão relacionadas entre si. A atividade de água indica a quantidade de água disponível para as reações bioquímicas, físico-químicas e enzimáticas necessárias para o desenvolvimento de microrganismos, assim como para a produção de toxinas (JAY, 1994). Dessa forma, o teor de água do produto constitui um importante fator para sua conservação, pois a redução no teor de água torna o ambiente desfavorável ao crescimento e à multiplicação de microrganismos deteriorantes e toxigênicos (SIQUEIRA, 1995).

Ao final de 25 dias de processamento, observou-se que o embutido controle mostrou a maior atividade de água entre os tratamentos (Figura 12), embora os valores de atividade de água tenham se apresentados próximos entre si, não havendo diferença estatística significativa no nível de 5%.

FIGURA 12 – VALORES DE ATIVIDADE DE ÁGUA, UMIDADE, PERDA DE PESO E REDUÇÃO DE DIÂMETRO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS EM 25 DIAS DE PROCESSAMENTO – EXPERIMENTO 1



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *Lactobacillus casei* + *starter*; Tratamento 3: *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* + *starter*; Tratamento 4: *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* + *starter*

O tratamento controle obteve valor de atividade de água de 0,886, enquanto que os demais tratamentos mostraram valores de 0,879, 0,878 e 0,860 para os Tratamentos 2, 3 e 4, respectivamente. Esses valores encontram-se abaixo do valor de atividade de água máxima de 0,90, recomendado pela legislação brasileira para o salame tipo italiano (BRASIL, 2000), próximos ao valor de 0,88 encontrado por GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL (2000) e de 0,87 citado por TERRA (2003) para garantir a segurança microbiológica do salame tipo italiano, visto que a atividade de água mostra-se como o fator mais importante para a conservação da maioria dos embutidos crus fermentados (MONFORT, 2002).

Relacionando a atividade de água com a perda de peso e a redução de diâmetro, verificou-se que o tratamento controle mostrou menores perdas de peso e redução de diâmetro, apresentando valores que diferiram estatisticamente em nível de 5% de significância dos valores obtidos para os demais tratamentos. Essa condição está relacionada ao maior valor de pH encontrado para o embutido do tratamento controle, que proporcionou menor perda de água do produto durante o processamento, haja vista que o pH é um dos principais fatores que influenciam na difusão da água do interior para a superfície do embutido (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

COELHO et al. (2000) encontraram valores de umidade para o salame tipo italiano de 42,29%, enquanto que CAMPOS (2002) obteve valores de umidade que variaram entre 38,7% a 43,6% e GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL (2000) obtiveram teor de 36% para o salame tipo italiano. Os valores de umidade obtidos para os embutidos após 25 dias de maturação foram 40,85%, 41,47%, 41,48%, 38,54% para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, mostrando-se dentro da faixa de umidade encontrada em salames tipo italiano.

A determinação da perda de peso é uma medida que mostra indiretamente a quantidade de água eliminada pelo embutido durante o período de secagem e depende da temperatura, umidade relativa no interior da câmara de maturação e do tempo de processamento (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

COELHO et al. (2000) citam que o salame tipo italiano pode perder até 40% de seu peso durante o processamento. A perda de peso encontrada para os embutidos dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 foi de 29,94%, 33,04%, 34,08% e 33,84%, respectivamente, mostrando que os embutidos com culturas probióticas apresentaram perdas de peso semelhantes, cujos valores mostraram diferença estatística significativa em relação à perda de peso verificada no tratamento controle ($p \leq 0,05$).

A maior perda de peso obtida para os tratamentos adicionados de culturas probióticas está relacionada à acidificação muito intensa da massa, que facilita a quebra de peso dos embutidos. GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL (2000) obtiveram perda de peso de 44% para salame tipo italiano após 20 dias de processamento. ERKKILÄ et al. (2001a) obtiveram perda de peso de 40% em salames fermentados por culturas de *L. rhamnosus* após 28 dias de processamento, cujo valor mostrou-se acima do valor encontrado para o Tratamento 3.

Para a redução de diâmetro verificou-se que o menor valor foi obtido para o tratamento controle. Embora o Tratamento 2 (*L. casei*) tenha apresentado valores de perda de peso, umidade e atividade de água próximos ao do Tratamento 3, sua redução de diâmetro mostrou-se superior. Essa condição pode ter sido causada pelo encolhimento desuniforme da superfície da peça durante a secagem, ocasionando diferenças na medida do diâmetro.

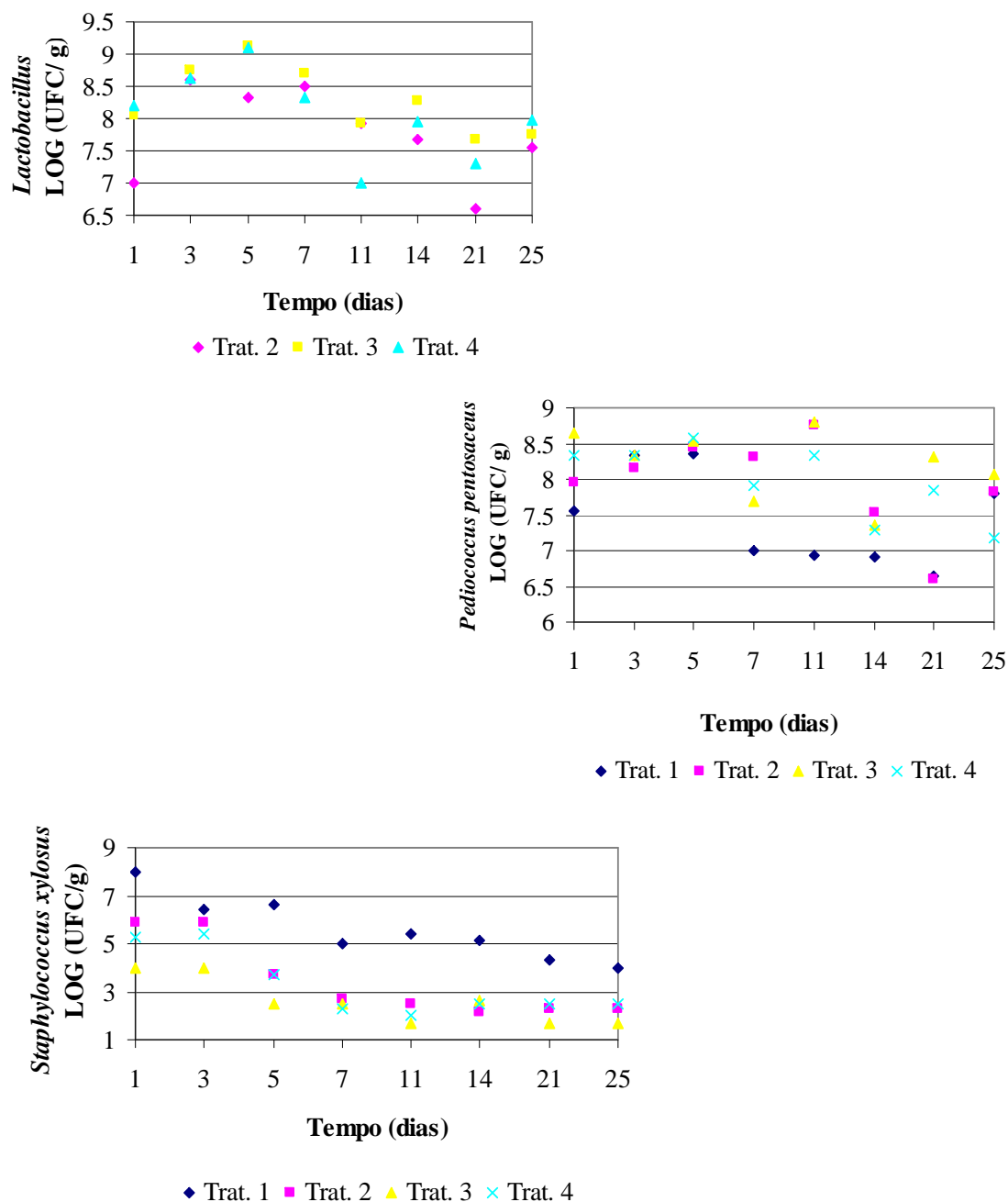
4.3.2 Análises Microbiológicas

As bactérias probióticas apresentaram crescimento no ambiente cárneo, com aumento no número de células viáveis nos primeiros dias de fermentação como pode ser visualizado na Figura 13. SAMESHIMA et al. (1998) verificaram que o número de células viáveis de *L. rhamnosus* e *L. paracasei* em salame mostrou-se próximo a 1×10^8 UFC/ g após 3 dias de fermentação a 20° C. A contagem inicial verificada para *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei* nos embutidos fermentados foi de 1×10^7 , $1,1 \times 10^8$ e $1,6 \times 10^8$ UFC/ g, observando-se o aumento desses valores para $3,9 \times 10^8$, $5,5 \times 10^8$ e $4,2 \times 10^8$ UFC/ g, respectivamente, no terceiro dia de fermentação.

A partir do sétimo dia, os *Lactobacillus* mostraram ligeira redução no número de células, porém mantendo valores acima de 10^6 UFC/ g, mínimo recomendado para efeito probiótico, até o final do processamento (FERREIRA, 2003). O número final de células viáveis obtido para *L. paracasei* foi de $9,5 \times 10^7$, para *L. rhamnosus* $5,5 \times 10^7$ e para *L. casei* $3,45 \times 10^7$, havendo diferença significativa no nível de 5% entre os tratamentos.

A contagem de *Pediococcus pentosaceus* nos embutidos não sofreu interferência negativa pela presença das culturas probióticas. Nos embutidos que receberam a adição dos *Lactobacillus* probióticos o número de células viáveis da bactéria láctica da cultura *starter* mostrou-se superior ao valor encontrado para o tratamento controle para a maioria dos períodos de tempo avaliados.

FIGURA 13 – CONTAGEM DOS *LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS, *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* E *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* DURANTE O PROCESSAMENTO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS – EXPERIMENTO 1



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *Lactobacillus casei* + *starter*; Tratamento 3: *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* + *starter*; Tratamento 4: *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* + *starter*. O número de células viáveis de *Lactobacillus* no Tratamento 1 não foi determinado.

A presença das culturas probióticas provocou intensa redução no pH dos embutidos, gerando também redução no número de células de *Staphylococcus xylosus* da cultura *starter*, haja vista que valores de pH inferiores a 5,7 afetam negativamente o desenvolvimento desse microrganismo (STAHNKE, 1995). Na presença dos lactobacilos, a contagem de *Staphylococcus xylosus* mostrou número de células viáveis inferior a 10^3 UFC/ g a partir do sétimo dia de fermentação, enquanto que no tratamento controle a população de *Staphylococcus xylosus* manteve-se mais estável, exibindo redução gradativa no número de células durante os 25 dias de processamento. Resultados semelhantes foram obtidos por PAPAMANOLI et al. (2003) em embutido grego fermentado após 27 dias de processamento, no qual a contagem de microrganismos da família *Micrococcaceae* mostrou-se inferior a 10^3 UFC/ g, devido ao baixo pH alcançado pelo produto, com valores próximo a 4,5.

Os microrganismos da família *Micrococcaceae* utilizados na cultura *starter* auxiliam na coloração, sabor e aroma dos embutidos. Contribuem na coloração devido à atividade das enzimas nitrato redutase e catalase, importantes para a formação e estabilidade da cor, além de prevenir contra a oxidação lipídica. Porém em condições de baixo pH, sua quantidade é drasticamente reduzida, podendo haver morte das células após o início da fermentação (TERRA; FRIES; TERRA, 2004). PINTO; PONSANO; HEINEMANN (2001) relatam que para que haja a formação da cor típica de produtos curados é necessário que o nitrato adicionado à carne sofra redução a nitrito através da ação da enzima nitrato redutase. As bactérias da família *Micrococcaceae* têm papel fundamental na redução do nitrato, porém sua ação é bastante reduzida em valores de pH menores que 5,4. Dessa forma, uma redução muito rápida do pH no início do processamento dos produtos cárneos pode interferir na obtenção da cor avermelhada característica. De acordo com TERRA; FRIES; TERRA (2004), valores de pH inferiores a 4,9 são considerados prejudiciais para o desenvolvimento da cor nos produtos cárneos.

Apesar da importância da família *Micrococcaceae* na cor, sabor e aroma dos embutidos, o reduzido número de células viáveis de *Staphylococcus xylosus* observado nos embutidos adicionados de culturas probióticas pareceu não afetar sensorialmente essas características quando comparados ao tratamento controle (Tabela 18), pois as pontuações recebidas pelos embutidos dos Tratamentos 2, 3 e 4 não apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) para os atributos de cor, sabor e aroma em comparação às pontuações do tratamento controle.

4.3.3 Avaliação Sensorial

Entre os atributos avaliados, verificou-se diferença significativa no nível de 5% entre os tratamentos somente para o gosto ácido. As pontuações atribuídas pelos provadores para o gosto ácido dos embutidos confirmam os resultados obtidos nas determinações de pH e acidez, que mostraram maior acidez para os Tratamentos 2, 3 e 4. Para esse atributo, as notas mais próximas a 9,0 indicam maior acidez ao paladar, enquanto que as notas mais próximas a 1,0 indicam pouca acidez do embutido.

As médias das notas atribuídas na avaliação sensorial aos embutidos fermentados após 25 dias de processamento estão apresentadas na Tabela 18.

TABELA 18 – MÉDIAS DAS NOTAS ATRIBUÍDAS PELOS PROVADORES AOS EMBUTIDOS FERMENTADOS EM CÂMARA DE MATURAÇÃO POR 25 DIAS – EXPERIMENTO 1

TRATAMENTOS	GOSTO ÁCIDO	SABOR	AROMA	COR	TEXTURA	ASPECTO
Tratamento 1 (controle)	5,33 ^a	6,38 ^a	5,27 ^a	5,88 ^a	5,94 ^a	7,05 ^a
Tratamento 2 (adição de <i>L. casei</i>)	6,77 ^b	6,44 ^a	6,33 ^a	5,77 ^a	5,22 ^a	5,72 ^a
Tratamento 3 (adição de <i>L. rhamnosus</i>)	7,00 ^b	5,44 ^a	5,88 ^a	5,50 ^a	6,00 ^a	6,38 ^a
Tratamento 4 (adição de <i>L. paracasei</i>)	5,95 ^{ab}	5,83 ^a	5,61 ^a	6,27 ^a	6,38 ^a	7,05 ^a

Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey no nível de 5%.

O embutido controle apresentou gosto ácido menos pronunciado do que os embutidos adicionados de culturas probióticas, verificando-se diferença estatística no nível de 5% de significância entre o controle e os tratamentos que receberam a adição de *L. casei* (Tratamento 2) e de *L. casei ssp. rhamnosus* (Tratamento 3).

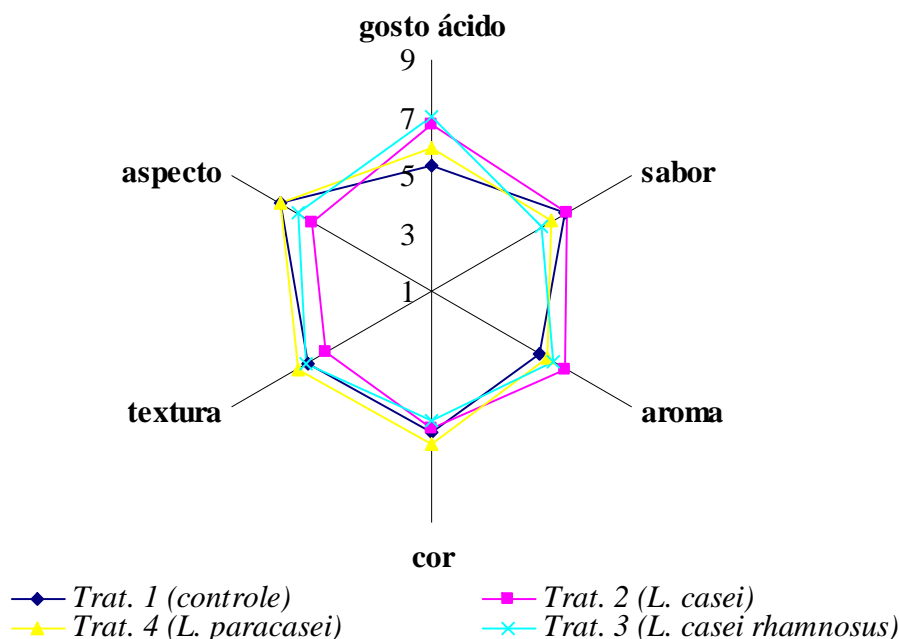
Entre os tratamentos que receberam as culturas probióticas, o embutido contendo *L. paracasei* (Tratamento 4) apresentou gosto ácido menos pronunciado, obtendo para esse atributo pontuação próxima à do tratamento controle.

O embutido adicionado de *L. rhamnosus* (Tratamento 3) mostrou intenso gosto ácido, característica que afetou também sua pontuação para o sabor, para o qual o referido

tratamento recebeu a menor nota, visto que o gosto ácido é um componente importante do sabor total dos produtos cárneos fermentados (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

As maiores pontuações para o sabor foram obtidas pelos embutidos do tratamento controle e do tratamento contendo *L. casei*. Este último também obteve a maior pontuação para o aroma, sendo que o tratamento controle recebeu a menor nota para esse atributo, (Figura 14). A sensação de sabor é causada primariamente por compostos não voláteis interagindo com a superfície da língua, enquanto que a sensação do aroma é causada por voláteis que evaporam do alimento durante o processo da mastigação e alcançam a cavidade nasal, onde reagem com receptores olfativos (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

FIGURA 14 – PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS 25 DIAS DE PROCESSAMENTO – EXPERIMENTO 1



O embutido adicionado de *L. paracasei* (Tratamento 4) mostrou coloração avermelhada mais intensa e textura mais firme em comparação com os demais, apresentando também menor pH final, menor teor de umidade e menor atividade de água. Essa condição proporcionou maior firmeza ao embutido permitindo uma estrutura sólida propícia ao fatiamento (CORETTI, 1971). A capacidade de fatiabilidade do embutido cárneo ocorre pela

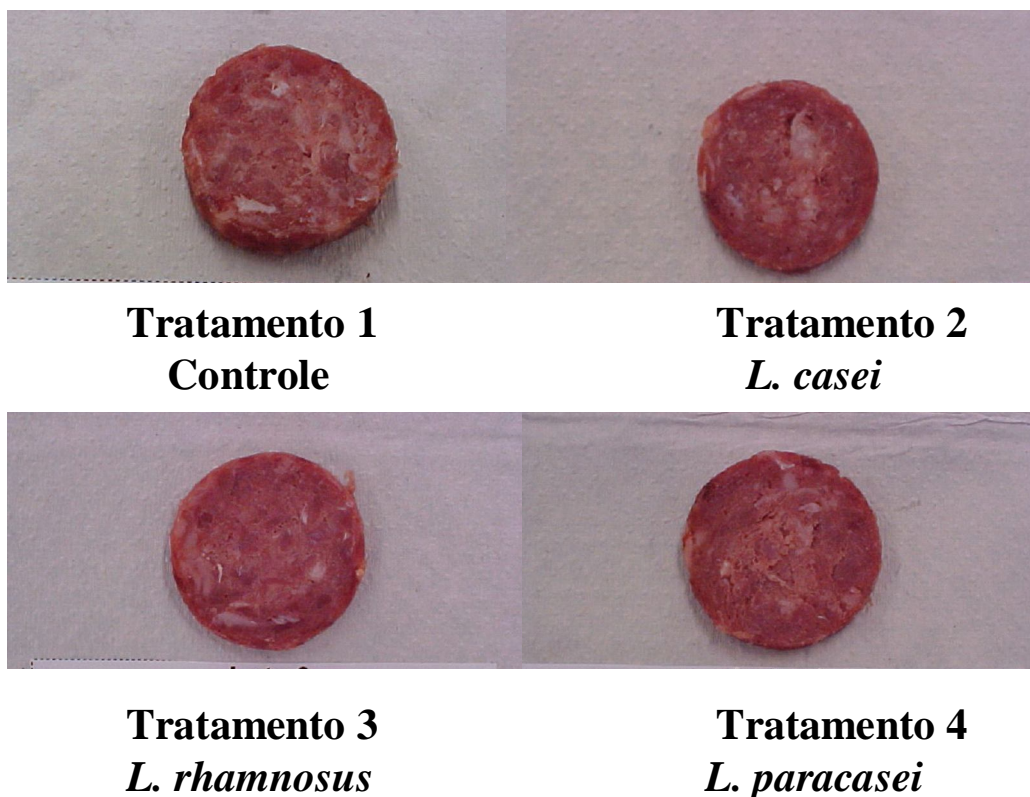
combinação da formação do gel, devido à acidificação das proteínas solubilizadas pelo sal, seguida da secagem (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

Observou-se que o Tratamento 3 (*L. rhamnosus*) recebeu a menor pontuação para a cor, seguido pelo Tratamento 2 e pelo Tratamento 1. No entanto, a textura apresentada pelo embutido adicionado de *L. rhamnosus* (Tratamento 3) mostrou-se mais firme do que aquela apresentada pelo embutido adicionado de *L. casei* (Tratamento 2).

A aparência geral ou aspecto representa o conjunto de todas as demais características avaliadas reunidas num único atributo. Para o aspecto geral, os Tratamentos 1 e 4 receberam as maiores pontuações, mostrando-se bem apreciados pelos provadores, considerando que a escala utilizada apresentava escore máximo de 9 pontos.

Embora tenham recebido menor pontuação do que os Tratamento 1 e 4, os Tratamentos 2 e 3 também foram considerados agradáveis pelos julgadores, pois obtiveram pontuações acima de 5,0. A Figura 15 mostra a aparência geral das peças de embutido fermentado, divididas mediante corte transversal, após 25 dias de processamento.

FIGURA 15 – APARÊNCIA GERAL DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS 25 DIAS DE PROCESSAMENTO – EXPERIMENTO 1



ANDERSEN (1998) verificou que a adição das culturas probióticas *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* ao salame não influenciou negativamente suas características de sabor e aroma, enquanto PIDCOCK; HEARD; HENRIKSSON (2002) relataram que a adição de *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *Bifidobacterium lactis* em salame não mostrou impacto negativo sobre suas propriedades sensoriais.

Considerando as características sensoriais avaliadas, verificou-se que a principal influência da adição das culturas probióticas aos embutidos nos Tratamentos 2, 3 e 4 foi sobre a acidez dos produtos, que apresentaram gosto notadamente mais ácido do que o tratamento controle. Para os demais atributos, o uso das culturas probióticas pareceu não afetar positiva ou negativamente as características sensoriais dos embutidos.

A partir dos resultados obtidos, buscou-se selecionar entre as três espécies de *Lactobacillus* testadas duas espécies para um novo experimento. Os tratamentos que receberam as culturas probióticas apresentaram resultados semelhantes nas análises físico-químicas e microbiológicas. Dessa forma, a seleção das espécies baseou-se nas características sensoriais dos embutidos.

Na avaliação sensorial, o embutido adicionado de *Lactobacillus paracasei* apresentou características bem apreciadas pelos julgadores, mostrando as maiores pontuações para aspecto geral, textura, cor e gosto ácido pouco pronunciado. Por outro lado, o embutido contendo *Lactobacillus casei* apresentou melhor sabor e aroma.

Diante do intenso gosto ácido, sabor menos apreciado e coloração mais pálida mostrada pelo tratamento que recebeu a adição de *L. rhamnosus*, tendo sido classificado pelos provadores como o tratamento menos preferido em teste de ordenação, as espécies de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei* foram selecionadas para o próximo experimento.

4.4. EXPERIMENTO 2

No Experimento 2 avaliou-se o efeito das culturas de *Lactobacillus paracasei* e de *Lactobacillus casei* sobre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais dos embutidos fermentados durante um período de 28 dias de processamento e 56 dias de armazenamento a vácuo, sob refrigeração.

A estocagem dos embutidos à temperatura de 4° C objetivou a manutenção da viabilidade das culturas probióticas, haja vista que seu efeito benéfico no organismo somente é exercido pela ingestão das células viáveis desses microrganismos (NICOLI et al., 2003).

Para esse experimento, a preparação dos inóculos de *L. paracasei* e de *L. casei* sofreu modificações visando diminuir o volume de caldo inoculado na massa e a temperatura inicial de incubação dos embutidos na câmara de maturação foi reduzida para 20° C com o intuito de evitar a intensa queda de pH verificada nos embutidos do primeiro experimento.

4.4.1 Determinações Físico-Químicas

4.4.1.1 Determinações de pH e acidez

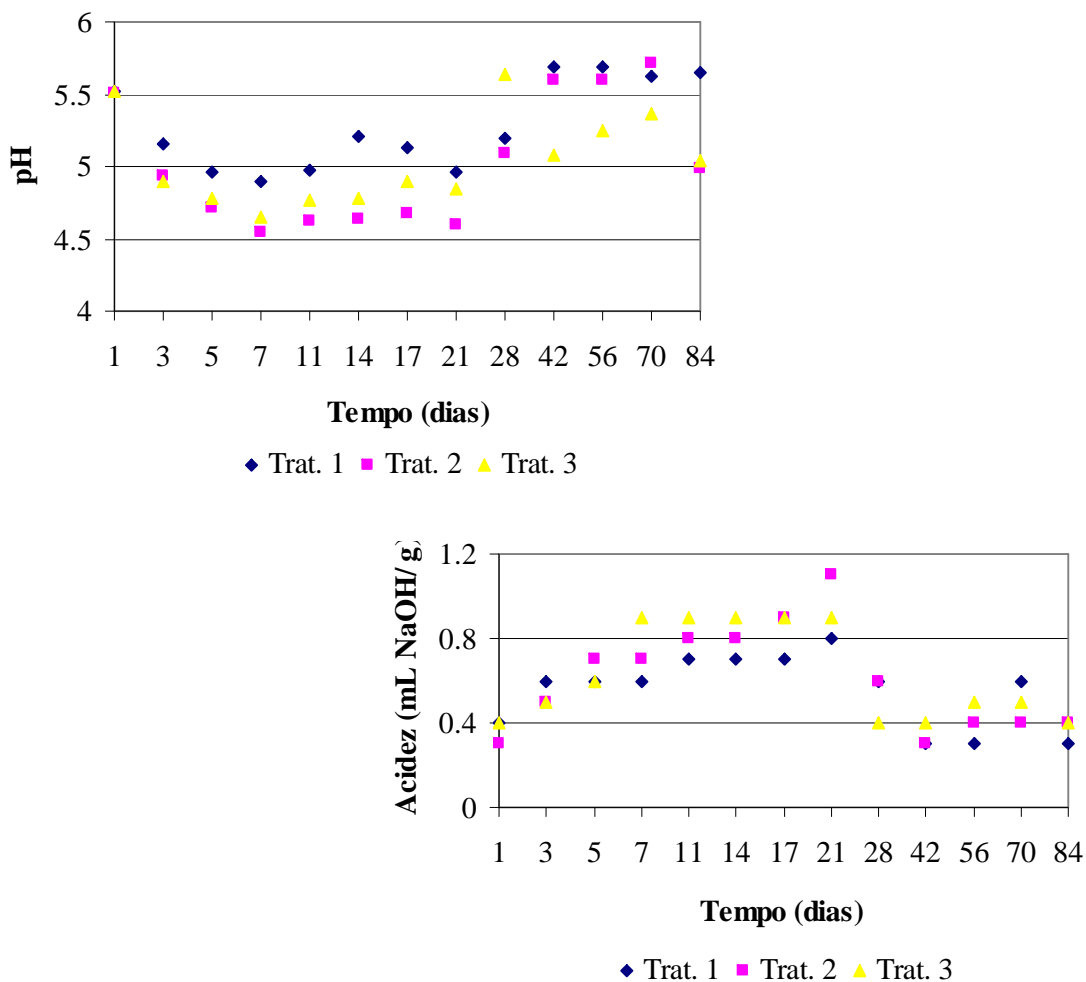
As variações de pH e acidez dos embutidos do tratamento controle e dos tratamentos adicionados de culturas probióticas durante o período de 28 dias de processamento e 56 dias de armazenamento sob refrigeração estão apresentadas na Figura 16.

No Experimento 2, a queda inicial de pH dos embutidos dos Tratamentos 2 e 3, adicionados de *L. paracasei* e *L. casei*, mostrou-se maior do que a queda de pH do embutido controle, porém mais próxima ao controle neste experimento do que no Experimento 1.

A velocidade de formação do ácido láctico nos produtos fermentados depende da atividade ácida da cultura microbiana adicionada, agregada à flora espontânea, açúcares e temperatura empregada durante a maturação (COELHO et al., 2000).

Os valores iniciais de pH (tempo 1) observados para o tratamentos controle, Tratamento 2 (*L. paracasei*) e Tratamento 3 (*L. casei*) foram 5,53, 5,51 e 5,52, respectivamente, alcançando no terceiro dia de fermentação valores de 5,16, 4,93 e 4,89. Os valores de pH verificados para os embutidos contendo *Lactobacillus* mostraram-se próximos ao valor encontrado por PAPAMANOLI et al. (2003), que obtiveram pH 4,9 em salame grego no quarto dia de fermentação. Por sua vez, ANDERSEN (1998) encontrou valores de pH de 4,6 e 4,7 para salames adicionados de *Lactobacillus casei* no sexto dia de processamento, mostrando-se próximos ao valor de pH de 4,65 verificado para o embutido do Tratamento 3 após 7 dias de processamento.

FIGURA 16 – EVOLUÇÃO DO pH E DA ACIDEZ DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS COM ADIÇÃO DE *L. PARACASEI* E *L. CASEI* DURANTE O PERÍODO DE PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO REFRIGERADO – EXPERIMENTO 2



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* + *starter*; Tratamento 3: *Lactobacillus casei* + *starter*
 Período de processamento de 28 dias e 56 dias de armazenamento a vácuo à temperatura de 4° C

O pH inicial da massa inferior a 5,8 favorece o crescimento das bactérias lácticas nos embutidos fermentados, devendo haver uma rápida queda para valores abaixo de 5,3, a fim de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (LÜCKE, 2000).

A partir do décimo quarto dia de processamento observou-se um ligeiro aumento no pH dos embutidos. O aumento de pH durante a fase final da maturação do salame ocorre pelas

complexas modificações bioquímicas como a produção de amônia e aminas pela descarboxilação ou descarbonização de alguns aminoácidos (CAMPOS, 2002).

Ao final de 28 dias de processamento, obteve-se valores de pH de 5,19, 5,09 e 5,64 e valores de acidez de 0,6, 0,6 e 0,4 mL de NaOH para os Tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente. CAVENAGHI; OLIVEIRA (1999) recomendam que o valor de pH do salame no término de seu processamento esteja próximo a 5,2, porém ao analisar seis marcas nacionais de salame tipo italiano encontraram valores de pH que variaram entre 5,31 e 5,75. CHAGAS (1998) indica que ao longo da vida de prateleira do salame, o pH se eleva lentamente devendo situar-se entre 5,2 e 5,4, pois além de auxiliar na obtenção das características bioquímicas, sensoriais e na conservação, é agradável ao paladar do consumidor brasileiro.

Ao longo do período de armazenamento dos embutidos, verificou-se pequeno aumento nos valores de pH para todos os tratamentos, contudo os embutidos dos Tratamentos 2 e 3 mostraram redução no pH no último período de amostragem (56 dias de armazenamento), o que pode ser devido à variação individual das amostras analisadas.

Ao final de 56 dias de armazenamento, os embutidos dos Tratamentos 1, 2 e 3 apresentaram valores de pH de 5,65, 4,99 e 5,04 e valores de acidez em mL de NaOH de 0,3; 0,4 e 0,4; respectivamente, havendo diferença significativa no nível de 5% entre os tratamentos somente para os valores de pH.

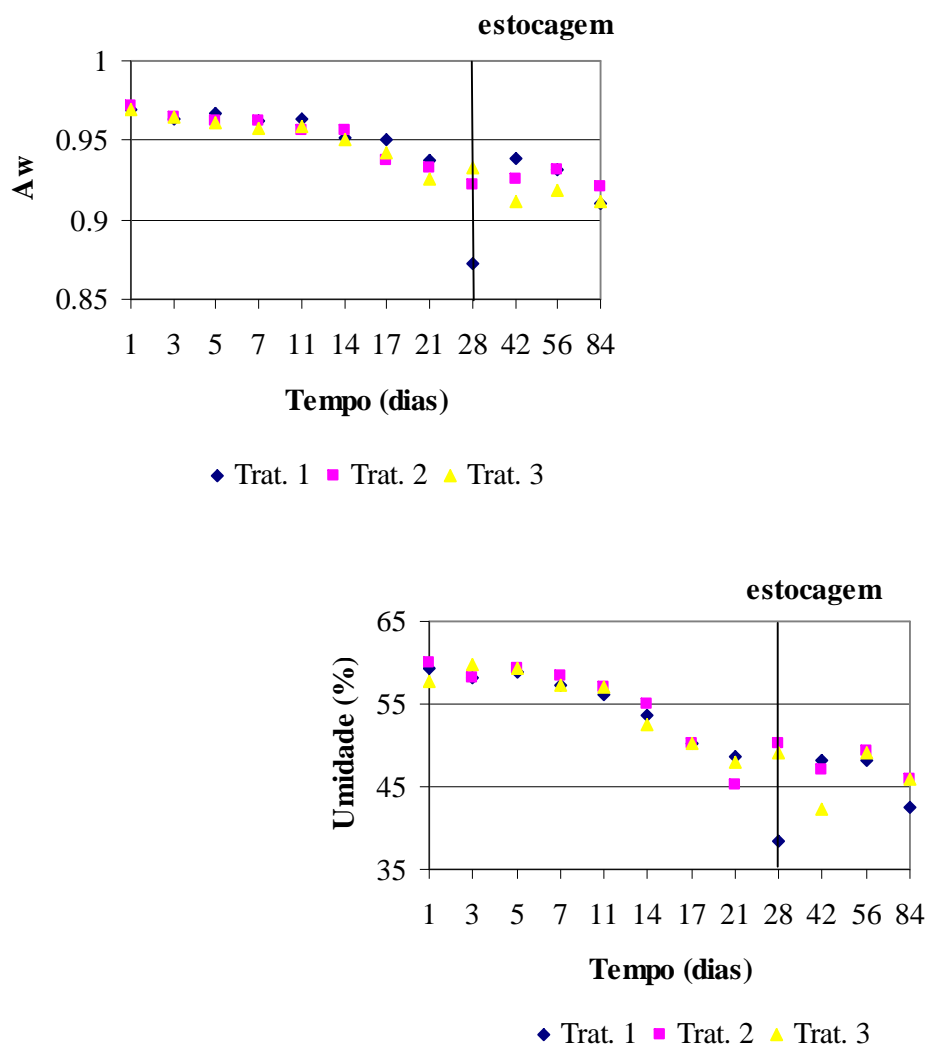
A queda do pH dos salames durante o processamento proporciona redução na capacidade de retenção de água da carne, facilitando a secagem do produto e reduzindo sua atividade de água (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

4.4.1.2 Determinações de atividade de água e umidade

Os valores de atividade de água e de umidade dos embutidos fermentados durante o processamento e o armazenamento refrigerado estão apresentados na Figura 17.

Os embutidos apresentaram redução gradual da atividade de água e da umidade, mostrando declínio semelhante para todos os tratamentos até 21 dias de processamento. O teor inicial de umidade nos embutidos dos Tratamentos 1, 2 e 3 foi 59,27%, 59,97% e 57,70%, com valores de atividade de água de 0,969, 0,972 e 0,969, respectivamente. Em ambas as determinações, os valores não diferiram estatisticamente entre si no nível de 5% de significância.

FIGURA 17 – VARIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA E DA UMIDADE DOS EMBUTIDOS CÁRNEOS ADICIONADOS DE *L. PARACASEI* E *L. CASEI* DURANTE 28 DIAS DE PROCESSAMENTO E 56 DIAS DE ARMAZENAMENTO – EXPERIMENTO 2



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* + *starter*; Tratamento 3: *Lactobacillus casei* + *starter*

Período de processamento de 28 dias e 56 dias de armazenamento a vácuo à temperatura de 4° C

A atividade de água constitui o mais importante fator para o crescimento microbiano e por isso sua diminuição torna-se o obstáculo de maior efeito sobre o crescimento de microrganismos indesejáveis no salame (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Valores de atividade de água iguais ou inferiores a 0,90 classificam os embutidos cárneos fermentados como produtos estáveis e também indicam o término da etapa de processamento desses produtos (CICHOSKI; TERRA; FREITAS, 2004). Porém, valores de atividade de água abaixo de 0,88 podem acarretar prejuízo à textura dos salames, tornando-os excessivamente firmes (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

Os embutidos do tratamento controle apresentaram após 28 dias de processamento valor de atividade de água de 0,87, indicando assim estabilidade e confirmando término da etapa de processamento. Por sua vez, os embutidos dos Tratamentos 2 e 3, nesse mesmo período, mostraram valores de atividade de água de 0,92 e 0,93, respectivamente.

Considerando a textura dos salames um atributo de grande incidência sobre sua qualidade final (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000) e verificando a reduzida atividade de água observada no tratamento controle (Tratamento 1), procedeu-se a finalização do período de processamento dos embutidos e o início da estocagem, embora os embutidos do Tratamento 2 (*L. paracasei*) e Tratamento 3 (*L. casei*) ainda necessitassem de maior período de processamento para redução na atividade de água. Optou-se por finalizar o período de fabricação dos embutidos dos três tratamentos aos 28 dias para mantê-los sob as mesmas condições de estudo e assim, permitir a comparação dos resultados.

A atividade de água e o teor de umidade mostrados pelos embutidos do tratamento controle, do Tratamento 1 e do Tratamento 2 apresentaram diferença significativa no nível de 5% para o tempo de 28 dias de processamento.

No entanto aos 14 dias de estocagem a vácuo à temperatura de 4° C (tempo 42 dias), o valor médio de atividade de água obtido para as amostras analisadas do Tratamento 1 (controle) foi 0,93, indicando que a atividade de água encontrada no tempo 28 deveu-se à variação das peças de embutido utilizadas na amostragem daquele período de tempo avaliado. Tendo em vista que a câmara de incubação utilizada para o processamento dos embutidos não dispunha de instrumento para o controle da umidade relativa e da circulação do ar em seu interior, a secagem dos embutidos não ocorreu de maneira uniforme para todas as peças de embutido.

A variação da umidade nos produtos cárneos depende de parâmetros externos como a umidade relativa e a renovação do ar na câmara de maturação, além de fatores internos como a superfície do tecido magro, pH e teor de gordura do produto (CICHOSKI; TERRA; FREITAS, 2004).

Os valores de atividade de água e os teores de umidade apresentados pelos embutidos dos três tratamentos a partir do tempo 42 dias até o término do armazenamento mostraram pequenas variações devido às diferenças individuais entre as peças dos embutidos, anteriormente citadas e também devido à migração de água que ocorre no interior dos embutidos fermentados embalados a vácuo durante a estocagem. Embora os embutidos tenham sido embalados em material plástico com alta barreira ao vapor d'água, formando um ambiente fechado que não permite praticamente perda de umidade para o exterior, as variações no teor de umidade e de atividade de água dos produtos cárneos fermentados durante o armazenamento são comuns, pois a água contida no interior do produto tende a migrar para a superfície na busca de um equilíbrio osmótico entre a casca e o interior do embutido (CICHOSKI, 2004).

Após 56 dias de armazenamento (tempo 84 dias), o teor de umidade encontrado para o tratamento controle foi 42,46% e a atividade de água 0,91, enquanto que para o Tratamento 2, adicionado de *L. paracasei*, obteve-se 45,82% de umidade e 0,92 de atividade de água e para o Tratamento 3, adicionado de *L. casei*, 45,98% de umidade e 0,91 de atividade de água. Embora os valores de atividade de água dos embutidos tenham se mostrado acima dos valores obtidos no Experimento 1, encontram-se dentro do limite máximo de 0,92 para a atividade de água de salame determinado pela legislação brasileira (BRASIL, 2000). TERRA et al. (2003) relatam que a redução da atividade de água dos produtos cárneos para valores inferiores a 0,93 é suficiente para suprimir o crescimento da maioria das bactérias patogênicas.

Na análise de variância verificou-se diferença significativa no nível de 5% para os valores de umidade entre o tratamento controle e os Tratamentos 2 e 3.

Apesar dos valores semelhantes de umidade apresentados pelos Tratamentos 2 e 3 ao final do armazenamento, a atividade de água do Tratamento 3 mostrou-se inferior à encontrada para o Tratamento 2, indicando conter menor teor de água livre em relação ao seu teor de água total.

A umidade dos alimentos representa o seu teor de água total, que inclui a água livre, disponível às reações bioquímicas, enzimáticas e aos microrganismos, e a água ligada ou de constituição. A atividade de água representa somente o teor de água livre e por isso, alimentos com o mesmo teor de umidade podem apresentar diferenças nos valores de atividade de água de acordo com a quantidade de água livre disponível (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

4.4.2 Análises Microbiológicas

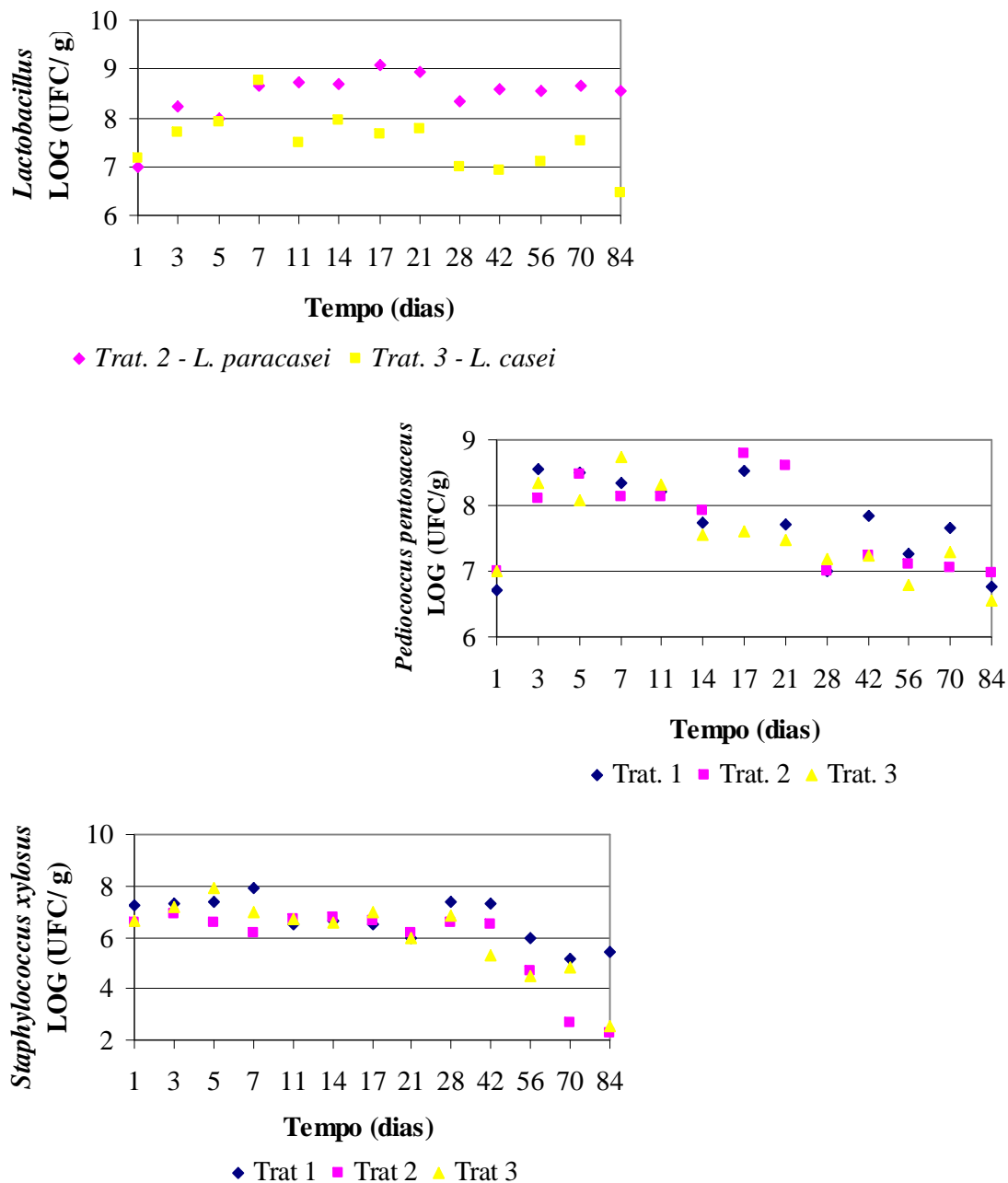
Nas análises microbiológicas verificou-se que o número de células viáveis das culturas probióticas durante o processamento e armazenamento manteve-se acima do número mínimo recomendado para exercer ação benéfica no organismo (Figura 18). Para a maioria dos períodos de amostragem avaliados, as contagens de *L. paracasei* (Tratamento 2) mostraram-se superiores às obtidas para *L. casei*.

ANDERSEN (1998) acompanhou o crescimento de *Lactobacillus casei* em embutido cárneo e obteve contagem de 5×10^7 UFC/ g no terceiro dia de processamento e 1×10^8 UFC/ g no sexto dia de maturação, que se manteve constante até o vigésimo dia de processamento. No Tratamento 3 (*L. casei*), a contagem de células durante o processamento foi de 5×10^7 UFC/ g no terceiro dia, 6×10^8 UFC/ g no sétimo dia e 6×10^7 UFC/ g no vigésimo dia. Inicialmente, a contagem de *L. casei* observada no Tratamento 3, mostrou-se semelhante à obtida por ANDERSEN (1998), porém apresentando-se superior no sexto dia e inferior no vigésimo dia de processamento, mas próxima à contagem verificada por PIDCOCK; HEARD; HENRIKSSON (2002) para *L. casei imunitas* em salame húngaro, onde obteve-se número de células de $6,7 \times 10^7$ UFC/ g no vigésimo primeiro dia de processamento.

Ao final de 28 dias de processamento, o número de células viáveis de *L. paracasei* no Tratamento 2 foi $2,25 \times 10^8$ UFC/ g e de *L. casei* no Tratamento 3 de 1×10^7 UFC/ g, verificando-se diferença significativa entre os tratamentos no nível de 5%.

As culturas probióticas permaneceram viáveis até o término do período de armazenamento, sendo observado crescimento estável para *Lactobacillus paracasei* que apresentou contagem final de $3,5 \times 10^8$ UFC/ g e pequena redução na contagem de *Lactobacillus casei* que apresentou número de células viáveis de 3×10^6 UFC/ g aos 56 dias de estocagem.

FIGURA 18 – CONTAGEM DE *LACTOBACILLUS*, *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* E *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* DURANTE O PROCESSAMENTO E ESTOCAGEM DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS – EXPERIMENTO 2



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* + *starter*; Tratamento 3: *Lactobacillus casei* + *starter*

Período de processamento de 28 dias e 56 dias de armazenamento a vácuo à temperatura de 4° C.

O número de células viáveis de *Lactobacillus* no Tratamento 1 não foi determinado.

O desenvolvimento das culturas probióticas nos embutidos dos Tratamentos 2 e 3 promoveu maior redução de seu pH em relação ao tratamento controle, o que pode ter influenciado o crescimento de *Staphylococcus xylosus* nesses embutidos, pois apresentaram menores contagens para o estafilococo em comparação ao tratamento controle. Porém, o número de células viáveis de *Staphylococcus xylosus* nos Tratamentos 2 e 3 manteve-se acima de 4×10^6 UFC/ g ao término do período de processamento (28 dias).

KRÖCKEL (1995) recomenda que a contagem dos microrganismos da família *Micrococcaceae* deve estar próxima a 10^6 UFC/ g para a obtenção de cor avermelhada nos embutidos cárneos. Apesar do número de células de *Staphylococcus xylosus* nos Tratamentos 2 e 3 ter se apresentado acima da quantidade recomendada, a cor desses embutidos mostrou-se prejudicada na avaliação sensorial, conforme mostrado no item 4.4.3.

Após 28 dias de processamento, observou-se declínio na contagem de *Staphylococcus xylosus* para todos os tratamentos, porém em menor proporção para o embutido do tratamento controle, havendo diferença estatística significativa no nível de 5% entre os tratamentos para o número de estafilococos ao final do período de estocagem (tempo 84 dias). A contagem final de *Staphylococcus xylosus* obtida nos embutidos dos Tratamentos 1, 2 e 3 foi $2,5 \times 10^5$ UFC/ g, 2×10^2 UFC/ g e $3,5 \times 10^2$ UFC/ g, respectivamente.

Durante o período de armazenamento a vácuo dos produtos cárneos fermentados, a população de microrganismos da família *Micrococcaceae* tende a diminuir à medida em que avança o tempo de estocagem (CICHOSKI, 2004).

O número de células de *Pediococcus pentosaceus* apresentou incremento para todos os embutidos nos primeiros dias de processamento, verificando-se as maiores contagens para o Tratamentos 3 e 2 nos tempos 7 ($5,5 \times 10^8$ UFC/ g) e 17 ($6,1 \times 10^6$ UFC/ g), respectivamente. Ao final do período de processamento (28 dias), as contagens de pediococos apresentaram valores de 1×10^7 , 1×10^7 e $1,5 \times 10^7$ UFC/ g para os Tratamentos 1, 2 e 3, não sendo verificada na análise estatística diferença significativa no nível de 5% entre os tratamentos.

Durante o armazenamento, o número de células de *Pediococcus pentosaceus* manteve-se estável, exibindo contagens finais de $5,7 \times 10^6$ UFC/ g para o Tratamento 1, $9,5 \times 10^6$ UFC/ g para o Tratamento 2 e $3,5 \times 10^6$ UFC/ g para os Tratamentos 3.

Esses resultados mostraram que a presença das culturas de *Lactobacillus paracasei* e de *Lactobacillus casei* nos embutidos não influenciou o desenvolvimento da bactéria láctica da cultura *starter*.

As bactérias lácticas têm sido empregadas nos produtos cárneos fermentados com a finalidade de proporcionar segurança, aumentar a estabilidade e inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (LÜCKE, 2000; ERKKILÄ et al., 2001b; TYÖPPONEN et al., 2003).

4.4.3 Avaliação Sensorial

A avaliação sensorial dos embutidos fermentados foi realizada após o período de processamento, aos 28 dias e após o período de armazenamento a 4° C, aos 84 dias, com o intuito de verificar a evolução dos parâmetros de qualidade sensorial durante o armazenamento.

A Tabela 19 mostra os valores médios obtidos para o gosto ácido, sabor, aroma, cor, textura e aspecto dos embutidos dos Tratamentos 1, 2 e 3 ao término do período de processamento e armazenamento.

TABELA 19 – MÉDIAS DAS NOTAS ATRIBUÍDAS PELOS PROVADORES AOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS O PROCESSAMENTO (TEMPO 28 DIAS) E APÓS 56 DIAS DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (TEMPO 84 DIAS) - EXPERIMENTO 2

ATRIBUTOS	PERÍODOS DE AVALIAÇÃO	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2	TRATAMENTO 3
Gosto ácido	Tempo 28 dias	5,16 ^a	4,94 ^a	4,44 ^a
	Tempo 84 dias	5,72 ^a	5,22 ^a	6,22 ^a
Sabor	Tempo 28 dias	7,38 ^a	6,88 ^a	6,44 ^a
	Tempo 84 dias	7,05 ^a	6,27 ^a	6,00 ^a
Aroma	Tempo 28 dias	6,16 ^a	5,55 ^a	6,16 ^a
	Tempo 84 dias	7,11 ^a	6,05 ^a	5,72 ^a
Cor	Tempo 28 dias	7,38 ^a	5,11 ^b	5,05 ^b
	Tempo 84 dias	7,66 ^a	5,11 ^b	6,16 ^b
Textura	Tempo 28 dias	6,38 ^a	5,05 ^{ab}	4,61 ^b
	Tempo 84 dias	6,61 ^a	4,88 ^b	6,05 ^{ab}
Aspecto	Tempo 28 dias	7,55 ^a	7,27 ^a	7,00 ^a
	Tempo 84 dias	7,05 ^a	6,27 ^a	6,61 ^a

Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey no nível de 5%.

Tratamento 1: Controle (*starter*); Tratamento 2: *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* + *starter*; Tratamento 3: *Lactobacillus casei* + *starter*

Os tratamentos mostraram diferença significativa no nível de 5% para os atributos de cor e textura aos 28 dias de processamento e aos 56 dias de armazenamento.

O tratamento controle obteve as maiores pontuações para cor, recebendo nota 7,38 e 7,66 para os tempos 28 dias e 84 dias, respectivamente, apresentando diferença estatística significativa em relação aos demais tratamentos. Para esse atributo, o Tratamento 2 (*L. paracasei*) obteve nota 5,11 para ambos os períodos de avaliação e o Tratamento 3 (*L. casei*) recebeu nota 5,05 e 6,16 para os tempos 28 dias e 84 dias, não havendo diferença na análise estatística entre esses tratamentos nos períodos avaliados.

A coloração mais pálida dos embutidos adicionados de culturas probióticas em comparação ao controle estaria relacionada ao maior teor de umidade verificado para os Tratamentos 2 e 3, que tornou a superfície dos produtos mais clara e de coloração rosada.

O maior teor de umidade dos embutidos dos Tratamentos 2 e 3 também afetou sua textura que se mostrou menos apreciada pelos provadores em comparação ao tratamento controle. A análise estatística comprovou haver diferença significativa entre os tratamentos com relação à textura, tanto ao final do processamento dos embutidos (28 dias) como após 56 dias de armazenamento refrigerado (84 dias).

O menor teor de umidade obtido para o tratamento controle tornou sua textura mais firme e consistente, pois a redução da umidade torna a matriz da carne mais compacta, contribuindo para o aumento da firmeza do produto (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000). O embutido do Tratamento 2 (*L. paracasei*) mostrou melhor textura do que o do Tratamento 3 (*L. casei*) na avaliação do tempo 28 dias, cujas notas atribuídas foram 5,05 e 4,61, respectivamente. No entanto, no tempo 84 dias, a textura do embutido do Tratamento 3 mostrou-se mais firme, obtendo nota 6,05 contra 4,88 do embutido do Tratamento 2. Para ambos os períodos avaliados, os valores de textura não mostraram diferença significativa no nível de 5% entre os Tratamentos 2 e 3.

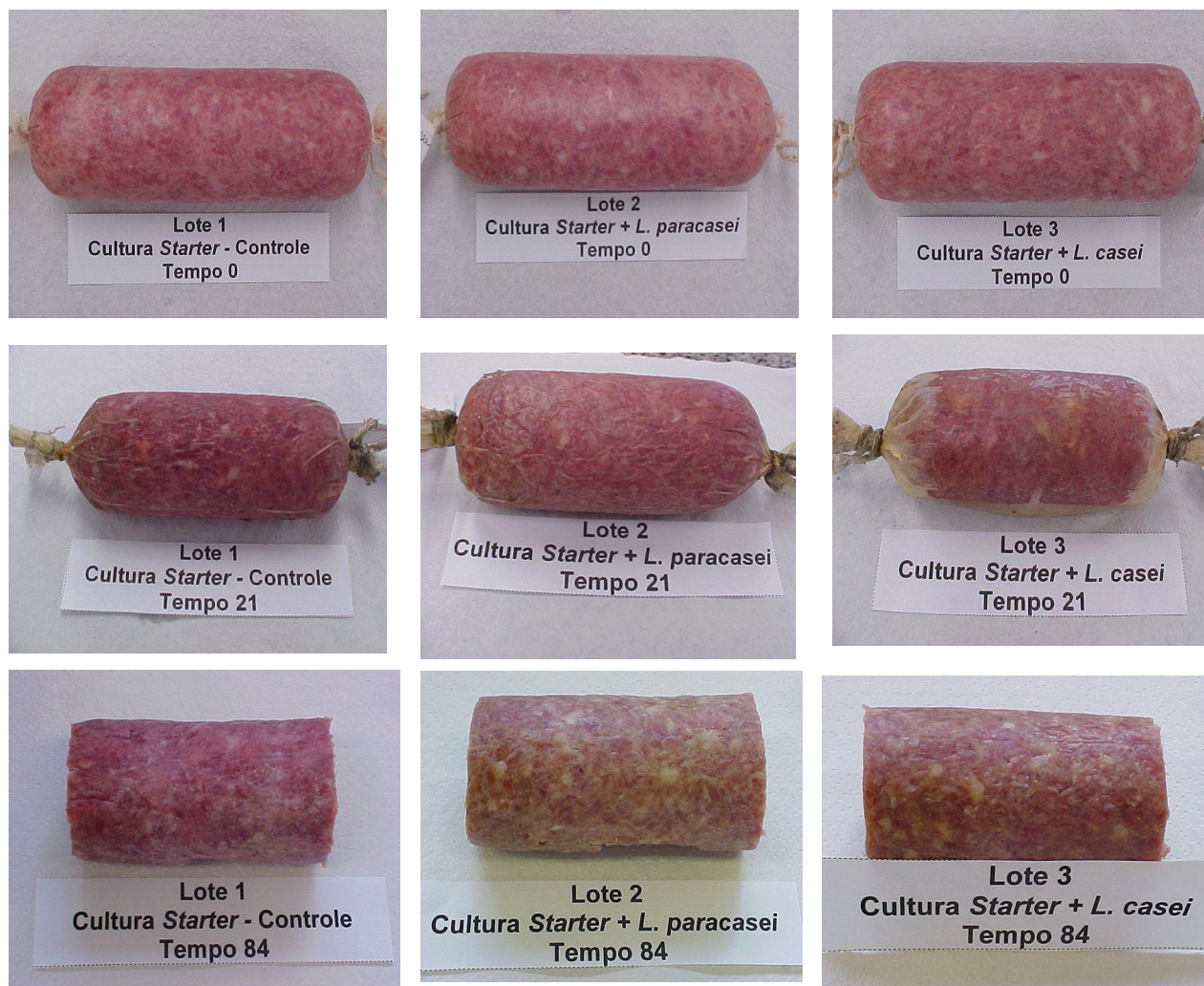
A coloração mais escura e a textura mais compacta do embutido do Tratamento 1 em relação aos embutidos dos Tratamentos 2 e 3, assim como a mudança no aspecto dos produtos durante o processamento e ao final do armazenamento podem ser visualizados na Figura 19.

Para o gosto ácido dos embutidos, avaliado após 28 dias de processamento, os provadores conferiram a maior nota ao embutido controle, indicando que esse tratamento mostrava maior acidez ao paladar. Ao final do período de armazenamento, a maior acidez ao paladar foi atribuída ao Tratamento 3 (*L. casei*).

ANDERSEN (1998) avaliou as características sensoriais de salames com adição de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* e verificou que o embutido adicionado de *L. casei* apresentou-se ligeiramente mais ácido do que os demais na avaliação sensorial.

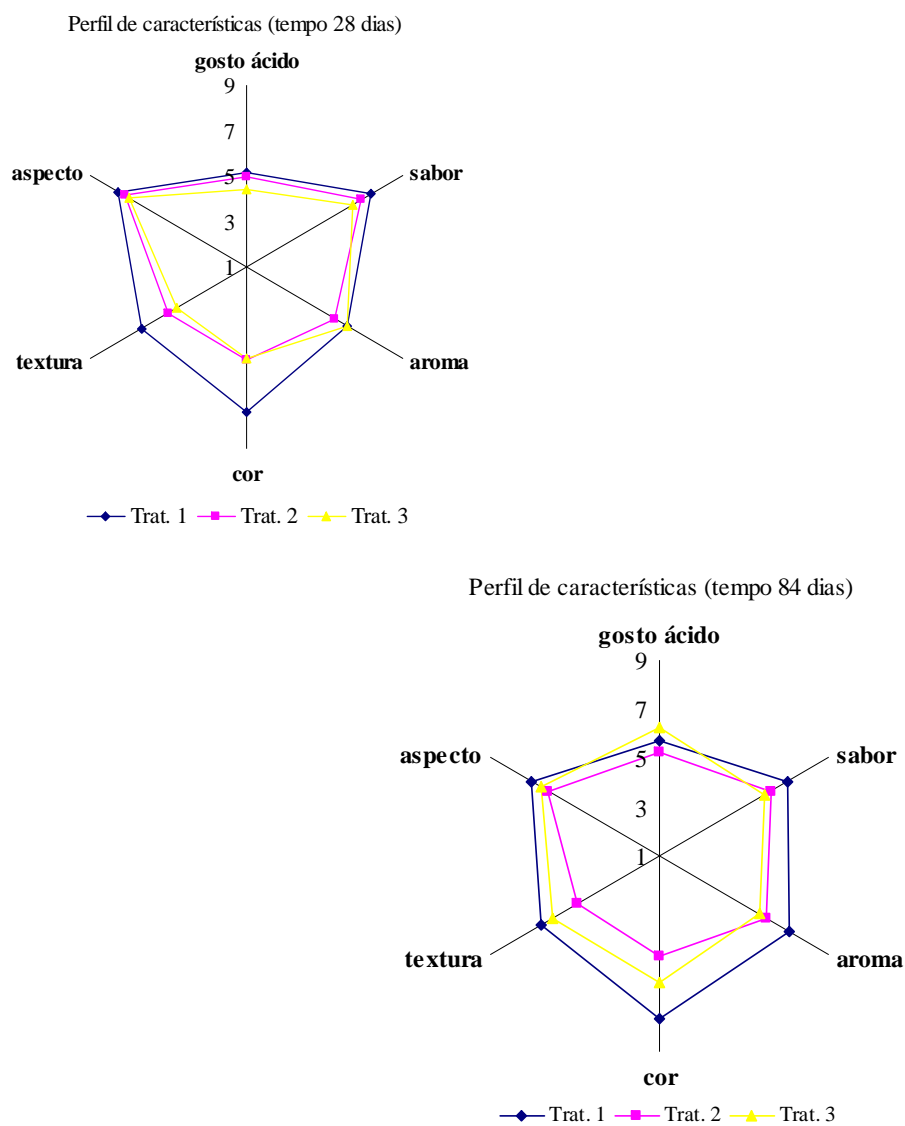
O sabor e o aroma dos embutidos do tratamento controle mostraram-se mais apreciados pelos provadores do que o sabor e o aroma dos embutidos dos Tratamentos 2 e 3 após 28 dias de processamento e 56 dias de estocagem. Essa condição pareceu ser devido à maior contagem dos microrganismos da família *Micrococcaceae* observada nos embutidos do Tratamento 1, pois as bactérias dessa família são os maiores contribuintes para o sabor e aroma dos embutidos fermentados (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

FIGURA 19 – APARÊNCIA GERAL DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS DOS TRATAMENTOS 1, 2 E 3 NO INÍCIO DO PROCESSAMENTO, AOS 21 DIAS DE PROCESSAMENTO E APÓS 56 DIAS DE ARMAZENAMENTO A 4° C – EXPERIMENTO 2



Os embutidos dos Tratamentos 1, 2 e 3 exibiram aparência geral apreciada pelos provadores, recebendo escores próximos à nota 7,0 nas avaliações sensoriais realizadas aos 28 dias e aos 84 dias de estudo (Figura 20).

FIGURA 20 - CONFIGURAÇÃO DOS ATRIBUTOS AVALIADOS NOS EMBUTIDOS FERMENTADOS AO FINAL DO PROCESSAMENTO (TEMPO 28 DIAS) E APÓS ESTOCAGEM DE 56 DIAS SOB REFRIGERAÇÃO (TEMPO 84 DIAS) – EXPERIMENTO 2



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* + *starter*; Tratamento 3: *Lactobacillus casei* + *starter*

Apesar das pontuações obtidas pelos embutidos para o aspecto, verificou-se que algumas peças de embutido, principalmente dos tratamentos adicionados de culturas probióticas, apresentavam coloração mais pálida e amarelada nas extremidades, característica de reação de oxidação. Esse fenômeno pode ter sido causado pela menor população de *Staphylococcus xylosus* nos embutidos dos Tratamentos 2 e 3.

Os microrganismos da família *Micrococcaceae* possuem a capacidade de produzir catalase, enzima responsável pelo desdobramento de peróxido de hidrogênio, que pode ser formado como metabólito do desenvolvimento de algumas bactérias lácticas e que constitui um forte agente oxidante, causando defeitos na cor e no aroma dos produtos cárneos (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001). Aliado ao número reduzido de *Staphylococcus xylosus*, TERRA; TERRA; TERRA (2004) citam que os antioxidantes normalmente utilizados na fixação de cor dos produtos cárneos, como o ácido ascórbico, ascorbatos, ácido eritórbito e eritorbatos possuem ação muito discreta na eliminação dos radicais livres que iniciam a oxidação lipídica. Salientam ainda, que o uso de antioxidantes naturais como os extratos de alecrim, erva-mate, chá-preto e boldo têm desempenhado importante função antioxidante nos derivados cárneos.

Buscando melhorar os atributos sensoriais dos embutidos e reduzir os sinais de oxidação lipídica na superfície e extremidades das peças, um novo experimento foi realizado, sendo adicionado à massa dos produtos, extrato vegetal de marcela do campo (*Achryrocline satureioides* (Lam). DC) como agente antioxidante. Para esse novo experimento, somente uma cultura probiótica, *Lactobacillus paracasei*, foi selecionada para adição aos embutidos. Em virtude da semelhança de comportamento das duas culturas probióticas verificada pelos resultados obtidos nas análises físico-químicas e sensoriais dos embutidos, a escolha de *L. paracasei* baseou-se na sua maior habilidade em crescer e manter-se estável nos produtos durante o processamento e armazenamento, mostrando número de células viáveis até o final do período de estocagem bastante superior ao número de células de *L. casei*. A melhor adaptação verificada para *L. paracasei* ao ambiente cárneo confirma pesquisa de PAPAMANOLI et al. (2003) que estudaram 72 espécies bacterianas isoladas da flora natural de salame grego, elaborado sem a adição de cultura *starter* e verificaram que ao final de 27 dias de processamento, a cepa *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* mostrou-se predominante no produto.

4.5 EXPERIMENTO 3

No Experimento 3 verificou-se a influência da adição de extrato hidroetanólico de marcela do campo sobre a oxidação dos lipídeos, as características sensoriais e o desenvolvimento da cultura de *Lactobacillus paracasei* nos embutidos fermentados. Nesse experimento, os embutidos foram avaliados durante o período de 28 dias de processamento e 150 dias de armazenamento a vácuo sob refrigeração.

4.5.1 Determinações Físico-Químicas

4.5.1.1 Determinações de pH, atividade de água e umidade

A diminuição do pH e da atividade de água consiste em dois obstáculos que se formam durante a produção de embutidos fermentados e que são essenciais para conferir estabilidade, garantindo sua conservação GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL (2000).

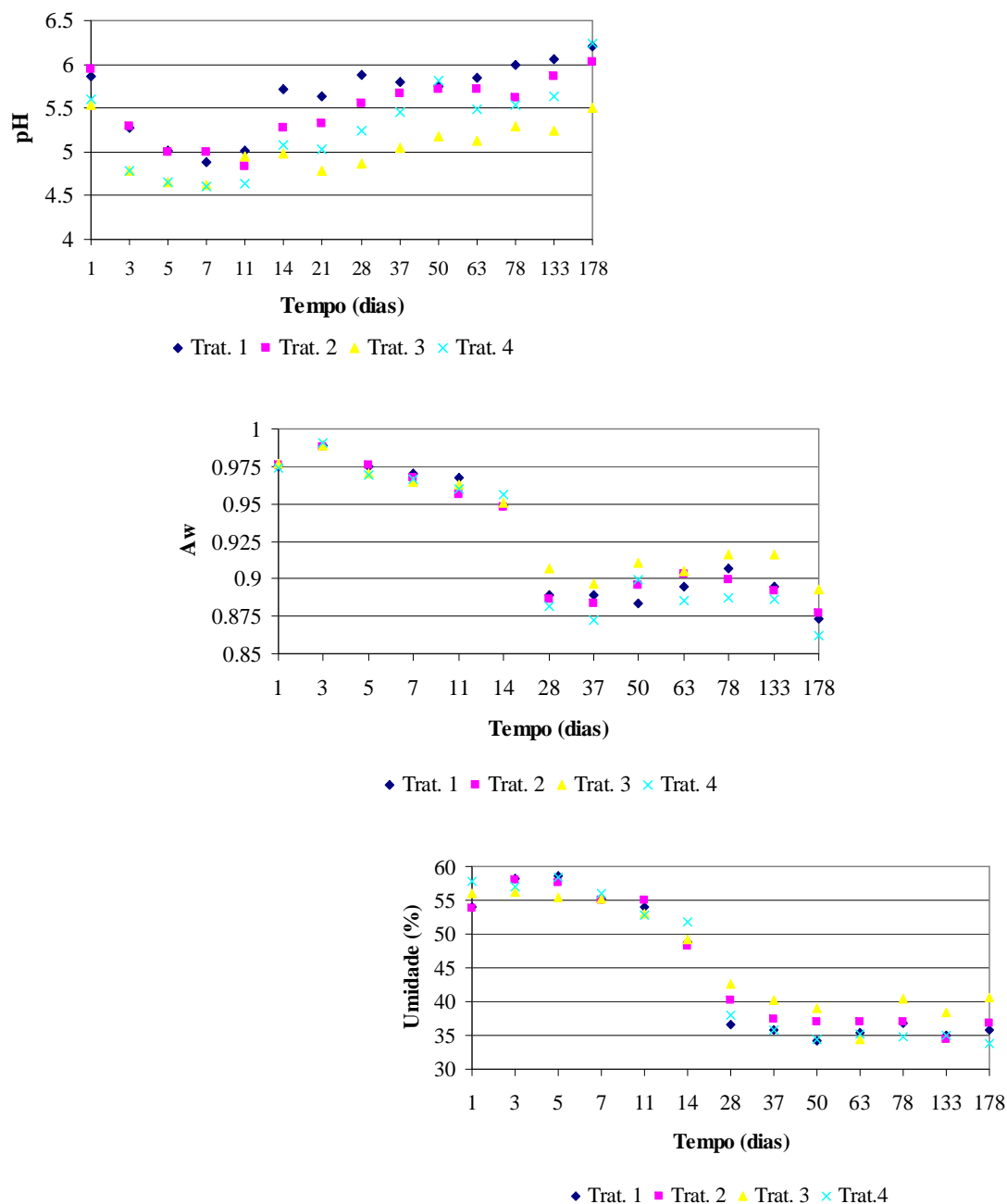
A evolução do pH, da atividade de água e da umidade dos embutidos dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 durante período de processamento e armazenamento está apresentada na Figura 21.

Na determinação de pH dos embutidos verificou-se redução inicial mais acentuada nos embutidos dos Tratamentos 3 e 4 que receberam a adição de *Lactobacillus paracasei*. No terceiro dia de fermentação obteve-se valor de pH 5,28 para o embutido do tratamento controle, pH 5,29 para o Tratamento 2 e pH 4,78 para os Tratamentos 3 e 4, sendo observada diferença estatística significativa no nível de 5% para esse parâmetro entre os embutidos com e sem a adição da cultura probiótica.

A queda inicial de pH deve ser rápida, entre 5,5 a 5,7, com a finalidade de criar condições favoráveis para o desenvolvimento da flora desejável. Nesse sentido, a queda do pH é fator mais importante para as características do salame tanto do ponto de vista sensorial como de saúde pública (COELHO et al., 2000).

Do terceiro ao décimo primeiro dia de processamento verificou-se pequena variação nos valores de pH dos embutidos, permanecendo os menores valores para os Tratamentos 3 e 4.

FIGURA 21 – EVOLUÇÃO DO pH, ATIVIDADE DE ÁGUA E UMIDADE DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS DURANTE 28 DIAS DE PROCESSAMENTO E 150 DIAS DE ESTOCAGEM SOB REFRIGERAÇÃO (TEMPO 178 DIAS) – EXPERIMENTO 3



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *starter* + extrato antioxidante de marcela do campo; Tratamento 3: *starter* + *Lactobacillus paracasei*; Tratamento 4: *starter* + *Lactobacillus paracasei*+ extrato antioxidante de marcela do campo. Período de processamento de 28 dias e 150 dias de armazenamento a vácuo à temperatura de 4° C

GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL (2000) observaram que o pH mínimo obtido para salame tipo italiano ocorreu no sétimo dia de processamento, verificando valor de pH de 4,90. Os embutidos fermentados dos Tratamentos 1, 3 e 4 também mostraram pH mínimo no mesmo período de processamento com valores de pH de 4,88, 4,62 e 4,61, respectivamente.

O Tratamento 2 exibiu pH mínimo aos 11 dias de processamento com valor de pH de 4,99. A partir do décimo primeiro dia observou-se aumento do pH para todos os tratamentos, porém com menor intensidade para o Tratamento 3. O aumento do pH está relacionado com a liberação de amônia no meio, pois a queda do pH no início da fermentação rompe os lisossomos das células musculares, liberando as proteases tissulares que atacam os protídios, produzindo amônia e elevando o pH (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

Aos 21 dias de processamento obteve-se valores de pH de 5,63, 5,32, 4,77 e 5,03 para os embutidos do tratamento controle, Tratamento 2 (extrato de marcela do campo), Tratamento 3 (*L. paracasei*) e Tratamento 4 (extrato de marcela do campo + *L. paracasei*). Para esse mesmo período de maturação, TERRA et al. (2003) obtiveram valores de pH que variaram entre 5,36 e 5,47 em salames tipo italiano adicionados de extrato antioxidante de erva-mate.

Após 28 dias de processamento, os embutidos apresentaram valores de pH de 5,88, 5,56, 4,86 e 5,25 para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, havendo diferença estatística significativa no nível de 5%.

O pH final após 20 dias de processamento obtido por GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL (2000) para salame tipo italiano foi 5,40, enquanto DETONI et al. (1994) verificaram valores de pH entre 5,45 e 5,92 após 28 dias de processamento. ZANARDI et al. (2004) obtiveram valores de pH de 5,79 e 5,5 para salames mediterrâneos processados por um período de 28 dias e 40 dias, respectivamente.

O pH atingido pela massa cárnea durante o processamento do salame é o resultado da compatibilização das culturas microbianas, tipo e quantidade de açúcar, bem como da temperatura na câmara de fermentação (TERRA; TERRA; TERRA, 2004).

Durante o período de estocagem, os embutidos que receberam a adição de *Lactobacillus paracasei* (Tratamentos 3 e 4) mostraram menores valores de pH até o final de 150 dias de estudo (tempo 178 dias). O embutido do Tratamento 3 exibiu os menores valores de pH, enquanto o embutido controle mostrou os valores mais altos para a maioria dos tempos de amostragem durante o período de armazenamento.

Ao longo de 150 dias de estocagem observou-se pouca variação no pH dos embutidos que mostraram valores finais de 6,21, 6,03, 5,51 e 6,24 para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A verificação do pH dos produtos cárneos é utilizada como um dos critérios de sua qualidade. Nesse sentido, valores de pH inferiores a 6,2 tornam os produtos cárneos mais protegidos contra a ação de microrganismos indesejáveis. Os valores de pH apresentados pelos embutidos fermentados após 150 dias de armazenamento apresentaram-se inferiores ou próximos ao limite recomendado, os quais somados ao emprego de temperaturas baixas e à presença de cloreto de sódio e sais de cura promoveram sua estabilidade microbiológica (TERRA; FRIES; TERRA, 2004; CICHOSKI, 2004).

Durante o período de processamento houve redução gradativa da atividade de água e da umidade dos embutidos, indicando que o processo de secagem ocorreu de forma constante, comportamento típico de secagem de produtos de umidade elevada e sob condições amenas de secagem (baixa temperatura e elevada umidade relativa do ar) (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

Partindo-se de valores iniciais de atividade de água e umidade de 0,975 e 53,91% para o Tratamento 1; 0,975 e 53,89% para o Tratamento 2; 0,976 e 56,06% para o Tratamento 3 e 0,973 e 57,87% para o Tratamento 4, obteve-se no décimo quarto dia de processamento os valores de 0,949, 0,947, 0,951 e 0,956 para a atividade de água e 48,73%, 48,13%, 49,17% e 51,75% para a umidade dos embutidos dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL (2000) observaram valor de 0,930 para atividade de água e 42% para o teor de umidade de salame tipo italiano aos 14 dias de processamento.

Os embutidos mostraram perfil semelhante de redução de atividade de água até o tempo 28, verificando-se valores de atividade de água de 0,889, 0,886 e 0,881 para os embutidos dos Tratamentos 1, 2 e 4, enquanto o embutido do Tratamento 3 atingiu valor de 0,906. Os valores de atividade de água obtidos para os embutidos que receberam a adição de 0,5% de extrato de marcela do campo (Tratamentos 2 e 4) foram semelhantes ao valor de 0,88 obtido por TERRA et al. (2003) para salames tipo italiano adicionados de 0,5% e 1% de extrato antioxidante de erva-mate. CAVENAGHI; OLIVEIRA (1999) encontraram valores inferiores aos obtidos no presente experimento em seis marcas de salame tipo italiano comercializadas no mercado nacional para as quais o teor de atividade de água variou entre 0,816 e 0,868.

Os teores de umidade obtidos para os embutidos dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 ao final do processamento foram 36,55%, 40,12%, 42,54% e 38%, respectivamente. CAMPOS (2002) obteve teores de umidade variando entre 38,7% e 43,6% para salame tipo italiano após período de 28 dias de processamento enquanto ZANARDI et al. (2004) verificaram teores de 30% e 38,6% em salames mediterrâneos após 28 dias e 40 dias de processamento, respectivamente.

Ao longo do período de estocagem, o embutido do Tratamento 3 (*L. paracasei*) mostrou os maiores valores de atividade de água em relação aos demais tratamentos, apesar de ter apresentado os menores valores de pH, mantendo essa tendência até o término de 150 dias, porém exibindo valores de atividade de água inferiores a 0,91 durante o armazenamento.

A capacidade de retenção de água da carne é afetada pelo pH, o qual em valores próximos de 5,2 (ponto isoelétrico das proteínas cárneas) promove igualdade entre o número de cargas elétricas positivas e negativas, tornando as proteínas mais insolúveis e reduzindo sua capacidade de retenção de água. Por outro lado, em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico, as cargas positivas predominam, causando repulsão entre as moléculas de proteína e elevando sua capacidade de reter água (YAMADA, 2005). Essa relação entre o pH e o teor de água da carne pode ter sido responsável pelos maiores valores de atividade de água e umidade observados para o Tratamento 3, que mostrou os menores valores de pH.

Durante o armazenamento, o Tratamento 4 apresentou os menores valores de atividade de água e umidade, verificando-se diferença significativa no nível de 5% ($p \leq 0,05$) entre os diferentes tratamentos ao final de 150 dias de estocagem (tempo 178).

Os teores de atividade de água e de umidade obtidos para os embutidos após 150 dias de armazenamento foram 0,873 e 35,76%, 0,877 e 36,74%, 0,893 e 40,60% e 0,862 e 33,84% para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Esses valores estão de acordo com os limites de atividade de água de 0,92 e de 40% de umidade estipulados pela legislação brasileira para salame (BRASIL, 2000) e que visam garantir a segurança microbiológica do produto pela inibição do crescimento de microrganismos patogênicos.

CICHOSKI (2004) cita que valores de umidade e de atividade de água inferiores a 64% e 0,93 atuam como obstáculos ao desenvolvimento da grande maioria dos microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, proporcionando segurança microbiológica aos produtos cárneos.

Os valores de atividade de água, inferiores a 0,90, obtidos para os embutidos fermentados agiram como barreira ao crescimento dos microrganismos da família

Enterobacteriaceae durante o processamento e estocagem, porém não afetaram o desenvolvimento da cultura de *Lactobacillus paracasei* nos embutidos, conforme mostrado na Figura 24.

4.5.1.2 Perda de peso e redução de diâmetro

Dentre as alterações físicas que o processo de secagem pode acarretar aos embutidos está o encolhimento do produto. Observa-se na Figura 22 a perda de peso e a redução de diâmetro dos embutidos durante 28 dias de processamento. Após esse período, os embutidos foram armazenados em embalagem plástica impermeável ao vapor d'água e ao oxigênio, não permitindo trocas gasosas ou perda de umidade para o exterior e por isso a perda de peso e a redução de diâmetro não foram determinadas durante a estocagem.

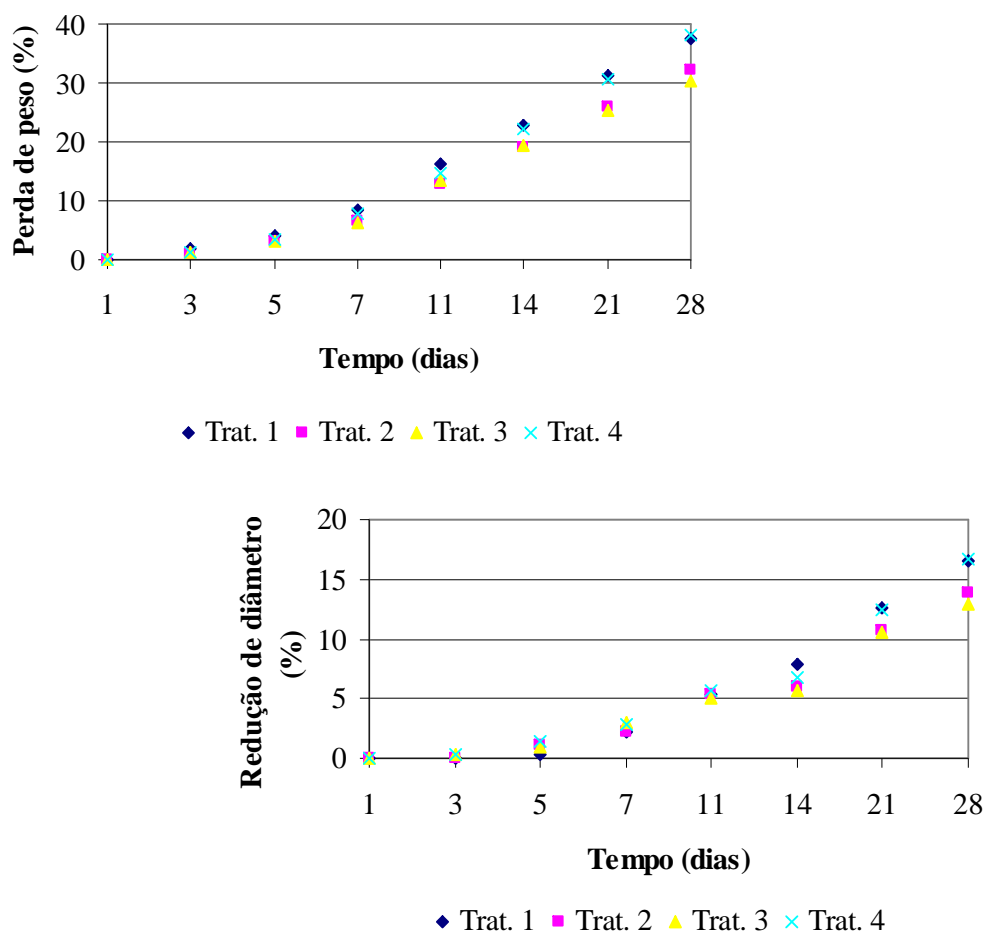
A perda de peso e a redução de diâmetro ocorreram praticamente na mesma proporção, devido ao processo lento de secagem que permitiu a acomodação da matriz do produto, ocupando o espaço anteriormente preenchido pela água (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000). Porém, as reduções de peso e de diâmetro dos produtos cárneos não correspondem somente à diminuição da umidade, mas também à perda de outras substâncias voláteis presentes (CICHOSKI, 2004).

Os embutidos dos Tratamentos 1 (controle) e 4 (*L. paracasei* + antioxidante natural) que mostraram os menores valores de atividade de água e de umidade após 28 dias de processamento também exibiram as maiores perdas de peso e redução de diâmetro, verificando-se diferença estatística significativa no nível de 5% para os referidos parâmetros entre esses tratamentos e os Tratamentos 2 e 3.

Ao final do período de processamento, os embutidos apresentaram perda de peso de 37,53%, 32,26%, 30,46% e 38,18% para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4. CAMPOS (2002) verificou perda de peso entre 37,9% e 40,7% para salame tipo italiano aos 28 dias de processamento.

As perdas de peso observadas nos Tratamentos 1 e 4 mostraram-se superiores à perda de peso de até 35%, ocasionada pelo fenômeno de desidratação, descrita por TERRA; TERRA; TERRA (2004) para salame tipo italiano.

FIGURA 22 – PERDA DE PESO E REDUÇÃO DE DIÂMETRO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS AO LONGO DO PERÍODO DE PROCESSAMENTO (28 DIAS) – EXPERIMENTO 3



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *starter* + extrato antioxidante de marcela do campo; Tratamento 3: *starter* + *Lactobacillus paracasei*; Tratamento 4: *starter* + *Lactobacillus paracasei*+ extrato antioxidante de marcela do campo

TERRA et al. (2003) verificaram perdas de peso acima de 40% em salames tipo italiano adicionados de antioxidante natural de erva-mate e antioxidante sintético hidroxibutilanisol (BHA). Essas perdas de peso mostraram-se maiores do que as do salame controle processado pelos referidos autores e foram justificadas pela insolubilidade dos antioxidantes na água. No presente experimento, a presença do extrato antioxidante de marcela do campo pareceu não influenciar a perda de peso dos embutidos.

Os valores obtidos para a redução de diâmetro dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram 16,55%, 13,83%, 12,92% e 16,72%, respectivamente, verificando-se menor redução de diâmetro e perda de peso para o embutido do Tratamento 3 em concordância com seu maior teor de umidade e de atividade de água.

4.5.1.3 Teor de proteínas e lipídeos

As proteínas exercem papel fundamental no desenvolvimento tecnológico dos embutidos cárneos, pois conferem liga ao produto e influenciam sua textura final, após a liberação de água decorrente da acidificação. Por sua vez, os lipídeos contribuem no sabor, aroma, textura e aparência do produto cárneo, além de atuar sobre suas propriedades reológicas e estruturais (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

Os teores de proteínas e lipídeos dos embutidos fermentados após o processamento e armazenamento estão apresentados na Figura 23.

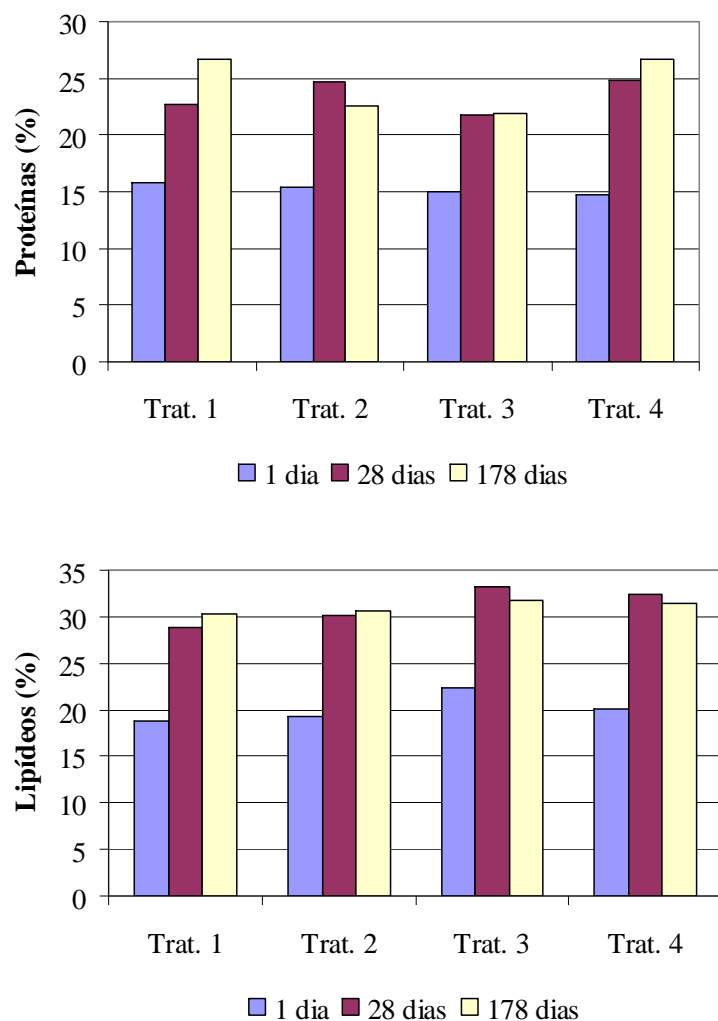
Para os teores de proteínas, os tratamentos não mostraram diferença estatística no nível de 5% de significância nos três períodos de tempo avaliados.

No início do processamento foram observados valores de proteínas de 15,75%, 15,45%, 15,05% e 14,75% para os embutidos dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Após 28 dias de processamento, os teores de proteínas sofreram aumento devido à secagem das peças, exibindo valores de 22,64% para o tratamento controle, 24,73% para o Tratamento 2, 21,81% para o Tratamento 3 e 24,78% para o Tratamento 4.

Ao final do período de armazenamento obteve-se teores de 26,62%, 22,54%, 21,96% e 26,66% para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4. Para ambos os períodos de amostragem (tempos 28 e 178 dias), o embutido do Tratamento 3 mostrou os menores teores de proteínas, porém em todos os tratamentos a quantidade de proteínas situou-se acima do limite mínimo de 20% recomendado pela legislação brasileira para o salame (BRASIL, 2000).

FRANCO (2001) cita que o teor médio de proteínas em salame é de 24,04%. Esse valor mostra-se inferior aos obtidos para os embutidos dos Tratamentos 1 e 4 após 150 dias de armazenamento, sendo importantes por conferirem textura e fatiabilidade aos produtos.

FIGURA 23- VALORES MÉDIOS DE PROTEÍNAS E LIPÍDEOS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS NO INÍCIO E FIM DO PROCESSAMENTO (28 DIAS) E APÓS ARMAZENAMENTO REFRIGERADO DE 150 DIAS (178 DIAS) – EXPERIMENTO 3



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *starter* + extrato antioxidante de marcela do campo; Tratamento 3: *starter* + *Lactobacillus paracasei*; Tratamento 4: *starter* + *Lactobacillus paracasei*+ extrato antioxidante de marcela do campo

Período de processamento de 28 dias e 150 dias de armazenamento a vácuo à temperatura de 4° C

ZANARDI et al. (2004) verificaram teores de proteínas que variaram entre 22% a 24% em salames mediterrâneos maturados pelo período de 28 dias e 40 dias, respectivamente. Por sua vez, BERAQUET (2005) relata os teores de 21% e 22% de proteína em peperoni e

salame genovês e classifica os embutidos fermentados secos como aqueles que atingem relação umidade proteína igual ou inferior a 2,3.

Os embutidos dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 estão incluídos na classificação de embutidos fermentados secos, pois obtiveram relação umidade proteína de 1,34; 1,62; 1,84 e 1,26, respectivamente, ao final de 150 dias de armazenamento.

Ao iniciar o processo de maturação dos embutidos, os teores de gordura observados para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4 foram 18,85%, 19,65%, 22,32% e 20,16%, verificando-se aumento desses valores para 28,77%, 30,14%, 33,14% e 32,34% após o processamento.

A perda de água dos embutidos fermentados durante a secagem promove a concentração dos demais componentes, aumentando seus teores no produto final (PRICE; SCHWEIGERT, 1994). Apesar de ter mostrado maior umidade em relação aos demais tratamentos, o embutido do Tratamento 3 apresentou também maior teor de gordura após 28 dias de processamento, o que pode ter sido decorrente do maior teor inicial de lipídeos verificado no produto (tempo 1 dia). Observou-se diferença significativa no nível de 5% para a porcentagem de lipídeos entre os tratamentos após o processamento.

Ao final de 150 dias de armazenamento, os embutidos apresentaram teores de gordura que variaram entre 30,37% (Tratamento 1) e 31,76% (Tratamento 3). Os valores obtidos mostraram-se acima do teor de 22,36% descrito por FRANCO (2001) para os lipídeos do salame, porém abaixo do valor máximo exigido pela legislação brasileira (máximo de 35%).

ZANARDI et al. (2004) encontraram valores de 31,9%, 34%, 35,7% e 42,8% para o teor de lipídeos de salames processados à maneira dos países mediterrâneos e países nórdicos, enquanto BERAQUET (2005) cita valores de 39% e 34% de gordura em peperoni e salame genovês.

4.5.1.4 Oxidação lipídica

Os valores de TBA obtidos para os embutidos fermentados após o processamento e durante o armazenamento estão apresentados na Tabela 20.

TABELA 20 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE TBA NOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS O PROCESSAMENTO E DURANTE A ESTOCAGEM – EXPERIMENTO 3

TEMPO (DIAS)	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2	TRATAMENTO 3	TRATAMENTO 4
1	0,29 ^b (±0,015)	0,28 ^b (±0,003)	0,48 ^a (±0,083)	0,45 ^{ab} (±0,007)
28	2,75 ^a (±0,260)	2,52 ^{ab} (±0,011)	2,26 ^b (±0,007)	1,74 ^c (±0,169)
50	0,98 ^b (±0,075)	0,95 ^b (±0,011)	1,41 ^a (0,000)	0,19 ^c (0,000)
78	0,59 ^c (±0,014)	0,91 ^a (0,000)	0,72 ^b (±0,024)	0,18 ^d (0,000)
133	1,43 ^b (±0,007)	1,23 ^c (±0,018)	3,33 ^a (±0,048)	0,92 ^d (±0,003)
178	0,78 ^b (±0,055)	0,86 ^a (±0,024)	0,90 ^a (±0,006)	0,86 ^a (±0,022)

Valores médios expressos em mg de malonaldeído/ kg de amostra. Valores entre parênteses representam o desvio padrão das médias. Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de significância.

Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *starter* + extrato antioxidante de marcela do campo; Tratamento 3: *starter* + *Lactobacillus paracasei*; Tratamento 4: *starter* + *Lactobacillus paracasei*+ extrato antioxidante de marcela do campo

No início do processamento (tempo 1), os embutidos dos Tratamentos 3 e 4 que receberam a adição da cultura de *Lactobacillus paracasei* apresentaram valores de TBA mais elevados do que aqueles obtidos para os Tratamentos 1 e 2, sendo observada diferença estatística significativa no nível de 5% entre esses tratamentos. No entanto, após 28 dias de processamento, os maiores valores de TBA foram encontrados nos embutidos dos Tratamentos 1 e 2 que atingiram concentrações de 2,75 e 2,52 mg de malonaldeído/ kg de amostra, respectivamente. A ação das enzimas lipolíticas, que liberam ácidos graxos livres altamente suscetíveis à oxidação nos produtos cárneos é influenciada por diversos fatores relacionados ao processo de fabricação como a quantidade e o tipo de gordura empregados, o teor de sal e de condimentos, o grau de moagem da carne, a temperatura de maturação, o pH e o potencial redox durante o processamento (CICHOSKI; TERRA, 2001; PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

As variações para o teor de TBA encontradas ao final do processamento não pareceram estar relacionadas ao teor de gordura dos embutidos, haja vista que os embutidos dos Tratamentos 1 e 2 que apresentaram os maiores valores de TBA continham os menores teores de gordura quando comparados aos Tratamentos 3 e 4.

BORGIO; ARAÚJO (2005) ressaltam que a suscetibilidade das gorduras à oxidação não depende apenas de seu teor em ácidos graxos insaturados e da natureza dos mesmos, mas também da posição desses na molécula lipídica e que os mecanismos de oxidação em sistemas biológicos complexos como os alimentos, onde os lipídeos encontram-se associados com matérias não lipídicas e possuem mobilidade restrita, podem ser bem diferentes daqueles que ocorrem em uma fase homogênea.

TERRA et al. (2003) encontraram teores de 0,7 a 1,2 mg de malonaldeído/ kg em salames tipo italiano adicionados de 0,5% e 1% de extrato antioxidante natural de erva-mate e antioxidante sintético (BHA) logo após o embutimento, verificando ação antioxidante das substâncias utilizadas pela redução dos valores de malonaldeído para teores próximos a 0,1 mg/ kg após 21 dias de processamento.

ZANARDI et al. (2004) recomendam o valor de TBA máximo de 0,5 mg de malonaldeído/ kg como limite para o aparecimento de odor e sabor característicos de rancidez em carne suína fresca e o valor de 1,0 mg de malonaldeído/ kg em carnes cozidas. Nesse sentido, os valores obtidos para os embutidos de todos os tratamentos ao final do processamento mostraram-se acima dos valores máximos indicados pelos referidos autores, que relatam ainda valores entre 0,04 a 0,30 mg de aldeído malônico/ kg encontrados em salames maturados pelo período de 14 a 40 dias.

CICHOSKI (2004) cita estudos que indicam que o aroma de ranço na carne é inicialmente detectado em valores de 0,5 a 2,0 mg de malonaldeído/ kg. Porém, apesar dos valores de TBA obtidos para os embutidos dos Tratamentos 1, 2 e 3 após 28 dias de processamento terem se mostrado acima de 2,26 mg de malonaldeído/ kg, não foi observada influência negativa sobre seu aroma na avaliação sensorial em comparação aos demais períodos de estocagem.

Para o período compreendido entre o fim do processamento (tempo 28 dias) até 105 dias de armazenamento (tempo 133 dias), o Tratamento 4 (*L. paracasei* + extrato de marcela do campo) apresentou os menores valores de TBA em relação aos demais tratamentos, indicando que a adição do extrato vegetal à sua formulação exerceu ação antioxidante sobre a rancificação dos lipídeos.

Contudo, o efeito antioxidante do extrato de marcela do campo nos embutidos do Tratamento 2 mostrou-se menos perceptível, haja vista que esse Tratamento apresentou maiores valores de TBA em relação ao tratamento controle aos 50 dias (tempo 78 dias) e 150 dias de armazenamento (tempo 178 dias), verificando-se diferença significativa entre esses tratamentos para os referidos períodos de estocagem.

Durante o armazenamento, os valores de TBA de todos os tratamentos apresentaram-se menores do que os obtidos no tempo 28 dias, com exceção do valor encontrado para o Tratamento 3 aos 105 dias de estocagem (tempo 133) que se apresentou muito superior aos demais.

Ao final de 150 dias de estocagem, os embutidos dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 mostraram valores de TBA que variaram entre 0,78 (Tratamento 1) e 0,90 mg de malonaldeído/ kg (Tratamento 3). CICHOSKI (2004) obteve valores de TBA variando entre 0,03 e 1,04 mg/ kg em paleta suína fermentada após 120 dias de armazenamento e relata que valores de TBA inferiores a 1,59 mg de aldeído malônico/ kg são considerados baixos para serem percebidos sensorialmente e não causam alarme para a saúde humana.

4.5.1.5 Determinação da cor

A cor dos produtos cárneos depende do teor de mioglobina presente na matéria-prima e da intensidade da reação de cura, onde a mioglobina é convertida a nitrosomioglobina (YAMADA, 2005).

As variações de umidade e atividade de água verificadas entre os tratamentos durante o processamento e o armazenamento mostraram influência principalmente sobre a luminosidade dos embutidos (TERRA; FRIES; TERRA, 2004). No início do processamento (tempo 1), os embutidos dos Tratamentos 1 e 2 apresentaram maior luminosidade em relação aos Tratamentos 3 e 4, porém não havendo diferença estatística significativa no nível de 5% entre os tratamentos (Tabela 21). No entanto, após 28 dias de processamento, o Tratamento 3 exibiu maior luminosidade, apresentando peças com mais brilho superficial e palidez em comparação aos demais tratamentos, mantendo valores mais elevados para o croma L^* até o final do período de estocagem.

A condição apresentada pelo Tratamento 3 pode ter sido causada pelo maior teor de umidade e de atividade de água encontrados para os embutidos desse tratamento, que aumentaram a reflexão da luz sobre sua superfície, conferindo mais luminosidade e maior brilho às peças, mas também deixando-as mais pálidas (SILVA, 1997). A coloração mais clara das peças do Tratamento 3 (*L. paracasei*) foi comprovada na avaliação sensorial, para as quais foram atribuídas as menores pontuações de cor em todos os períodos avaliados, conforme mostrado no item 4.5.3.

TABELA 21 – VARIAÇÃO DO CROMA L* NOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS PROCESSAMENTO E DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO – EXPERIMENTO 3

TEMPO (DIAS)	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2	TRATAMENTO 3	TRATAMENTO 4
1	52,83 ^a	51,46 ^a	50,94 ^a	50,64 ^a
28	42,99 ^b	44,89 ^{ab}	47,76 ^a	41,98 ^b
50	46,33 ^b	45,93 ^b	50,60 ^a	44,68 ^b
78	45,11 ^c	47,65 ^b	50,99 ^a	45,16 ^c
133	48,76 ^b	46,99 ^b	52,65 ^a	41,84 ^c
178	47,71 ^b	47,91 ^b	51,43 ^a	41,97 ^c

Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de significância.

Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *starter* + extrato antioxidante de marcela do campo; Tratamento 3: *starter* + *Lactobacillus paracasei*; Tratamento 4: *starter* + *Lactobacillus paracasei* + extrato antioxidante de marcela do campo

GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL (2000) obtiveram valores de luminosidade (L* de 36) inferiores aos obtidos para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4 no tempo 28, em salame tipo italiano após 20 dias de processamento, embora CAVENAGHI; OLIVEIRA (1999) tenham observado valores superiores aos obtidos, variando entre 47,6 e 49,6, para o croma L* em salames tipo italiano de seis diferentes marcas comercializadas no mercado nacional.

Os embutidos do Tratamento 4 (*L. paracasei* + extrato de marcela do campo), que apresentaram menores teores de umidade e de atividade de água ao final de 150 dias de armazenamento, mostraram menor intensidade de brilho e coloração mais escura do que os demais, enquanto que os embutidos dos Tratamentos 1 e 2 apresentaram valores intermediários de luminosidade durante o armazenamento.

Em todos os períodos de amostragem realizados a partir do final do processamento, verificou-se diferença estatística significativa no nível de 5% para a intensidade de luminosidade entre os tratamentos.

O pH dos produtos cárneos também exerce influência sobre a cor, interferindo na reação de formação de óxido nítrico e sua reação com a mioglobina da carne. TERRA; FRIES; TERRA (2004) citam que valores de pH abaixo de 4,9 são prejudiciais ao desenvolvimento de cor dos produtos cárneos e que a suscetibilidade dos pigmentos cárneos à oxidação aumenta com a queda do pH. Nesse sentido, o menor valor de pH verificado pelo Tratamento 3 durante o processamento e armazenamento dos embutidos influenciou em sua coloração mais clara. Porém, essa constatação não coincide com os resultados obtidos para a intensidade das cores vermelha e amarela apresentada pelos embutidos durante o processamento e armazenamento, pois para esses cromas o Tratamento 3 não apresentou os menores valores (Tabelas 22 e 23).

TABELA 22 – VARIAÇÃO DA COR VERMELHA (a*) NOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS PROCESSAMENTO E DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO – EXPERIMENTO 3

TEMPO (DIAS)	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2	TRATAMENTO 3	TRATAMENTO 4
01	15,43 ^{ab}	14,77 ^b	17,58 ^a	17,57 ^a
28	15,57 ^a	14,40 ^a	13,55 ^a	14,41 ^a
50	13,18 ^a	12,65 ^a	12,81 ^a	12,83 ^a
78	13,51 ^a	10,59 ^b	10,10 ^b	10,50 ^b
133	11,92 ^a	12,05 ^a	12,11 ^a	11,09 ^a
178	15,38 ^a	14,65 ^b	15,91 ^a	15,97 ^a

Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de significância.

Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *starter* + extrato antioxidante de marcela do campo; Tratamento 3: *starter* + *Lactobacillus paracasei*; Tratamento 4: *starter* + *Lactobacillus paracasei*+ extrato antioxidante de marcela do campo

O tratamento controle mostrou maior intensidade de cor vermelha para os tempos 28, 50 e 78 dias, enquanto que os demais tratamentos mostraram valores mais próximos entre si para os referidos tempos. Entre os períodos de análise citados, somente para o tempo 78, o tratamento controle apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação aos demais tratamentos.

No tempo 133 dias, o Tratamento 3 mostrou o maior valor para a cor vermelha, enquanto que ao final do armazenamento (tempo 178), o menor valor para o croma a* foi verificado no embutido do Tratamento 2 (extrato de marcela do campo) e o maior, no Tratamento 4 (*L. paracasei* + extrato de marcela do campo).

Ao término do armazenamento, os embutidos dos quatro tratamentos mostraram maiores valores para a cor vermelha do que aqueles apresentados por CAVENAGHI; OLIVEIRA (1999) para salame tipo italiano, que obtiveram resultados entre 11,6 a 15,5. GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL (2000) encontraram maior intensidade de cor vermelha em comparação aos embutidos dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4, em salame tipo italiano no vigésimo dia de processamento com valores variando entre 17,5 a 17,8.

Para a cor amarela, o Tratamento 4 apresentou maiores valores durante o armazenamento, porém com redução na sua intensidade no tempo 178 dias, para o qual esse tratamento mostrou o menor valor. Por outro lado, os Tratamentos 1, 2 e 3 exibiram intensidades variáveis de cor amarela ao longo do período de armazenamento, verificando-se que para todos os Tratamentos houve redução na intensidade do croma b* ao final da estocagem em relação ao início do processamento.

TABELA 23 – VARIAÇÃO DA COR AMARELA (b*) NOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS PROCESSAMENTO E DURANTE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO – EXPERIMENTO 3

TEMPO (DIAS)	TRATAMENTO 1	TRATAMENTO 2	TRATAMENTO 3	TRATAMENTO 4
01	16,83 ^a	16,78 ^a	14,79 ^b	14,00 ^b
28	12,98 ^a	12,71 ^a	12,27 ^a	12,59 ^a
50	11,14 ^b	12,03 ^a	11,47 ^{ab}	12,75 ^a
78	12,01 ^b	12,49 ^{ab}	12,86 ^{ab}	13,32 ^a
133	13,00 ^{ab}	13,28 ^{ab}	12,32 ^b	13,62 ^a
178	11,59 ^a	11,25 ^a	11,14 ^a	9,99 ^b

Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey no nível de 5% de significância.

Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *starter* + extrato antioxidante de marcela do campo; Tratamento 3: *starter* + *Lactobacillus paracasei*; Tratamento 4: *starter* + *Lactobacillus paracasei* + extrato antioxidante de marcela do campo

Os resultados obtidos pelos Tratamentos 2 e 4 não permitiram comprovar a ação antioxidante do extrato de marcela do campo sobre os pigmentos da carne, o que traria melhoria principalmente da intensidade da cor vermelha nesses tratamentos em relação aos Tratamentos 1 e 3. Além disso, as diferenças verificadas para a luminosidade entre os tratamentos pareceram estar relacionadas ao teor de água dos embutidos e não ao processo de oxidação dos pigmentos.

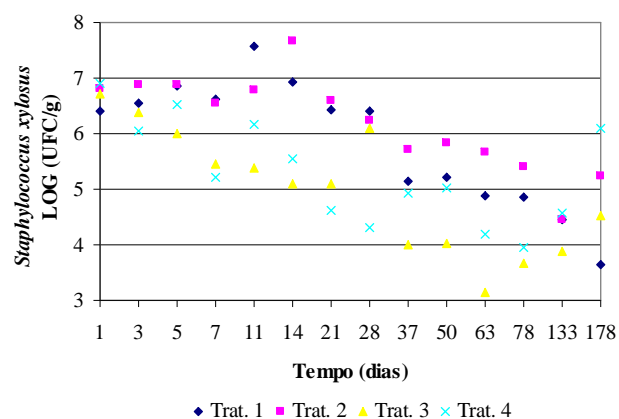
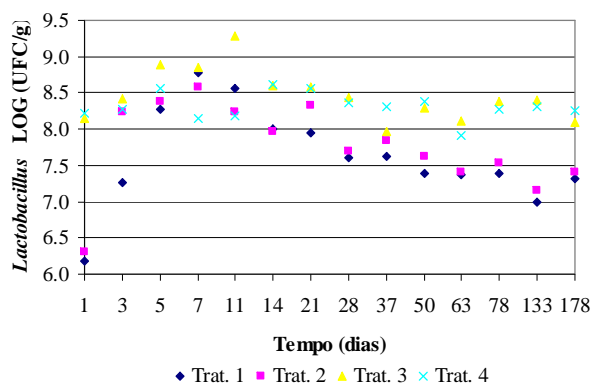
4.5.2 Análises Microbiológicas

Ao longo do período de processamento e estocagem dos embutidos, as contagens de *Lactobacillus* verificadas para os Tratamentos 1 e 2 mostraram-se inferiores às obtidas para os Tratamentos 3 e 4, haja vista que esses últimos receberam a adição de *Lactobacillus paracasei* e que as contagens obtidas para os embutidos dos Tratamentos 1 e 2 corresponderam apenas aos *Lactobacillus* da flora láctica contaminante da carne, pois esse gênero de microrganismo não estava presente na cultura *starter* utilizada. Dessa forma, o número de *Lactobacillus* determinado nos embutidos dos Tratamentos 3 e 4 poderia incluir tanto *Lactobacillus paracasei* como outros lactobacilos da flora microbiana da carne.

No sentido de verificar a proporção de *Lactobacillus paracasei* em relação ao número total de *Lactobacillus* nos embutidos dos Tratamentos 3 e 4, procedeu-se a seleção aleatória de 30 colônias de lactobacilos das placas de ágar MRS, submetendo-as à coloração de gram para identificação morfológica das células bacterianas em microscópio ótico. Os resultados obtidos na avaliação dos *Lactobacillus* comprovou que 66% a 70% das células viáveis encontradas nos Tratamentos 3 e 4 possuíam características micromorfológicas semelhantes à cultura pura de *Lactobacillus paracasei*, mostrando seu desenvolvimento e predomínio em relação aos demais lactobacilos contaminantes nos embutidos.

No início do processamento, o número de células viáveis de *Lactobacillus* observado para os Tratamentos 1 e 2 foi $1,5 \times 10^6$ e 2×10^6 UFC/ g, enquanto os Tratamentos 3 e 4 obtiveram contagens de *Lactobacillus paracasei* de $1,4 \times 10^8$ e $1,6 \times 10^8$ UFC/ g, verificando-se diferença significativa no nível de 5% entre os valores obtidos para esses tratamentos e os Tratamentos 1 e 2 (Figura 24). PIDCOCK; HEARD; HENRIKSSON (2002) obtiveram valores entre $1,5 \times 10^7$ e $4,5 \times 10^7$ UFC/ g para o número de *L. paracasei* no terceiro dia de fermentação de salame húngaro.

FIGURA 24 – EVOLUÇÃO NA CONTAGEM DA CULTURA PROBIÓTICA E DA CULTURA *STARTER* DURANTE O PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS – EXPERIMENTO 3



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *starter* + extrato antioxidante de marcela do campo; Tratamento 3: *starter* + *Lactobacillus paracasei*; Tratamento 4: *starter* + *Lactobacillus paracasei*+ extrato antioxidante de marcela do campo

Houve também grande aumento no número de células de *Lactobacillus* para todos os tratamentos até o décimo primeiro dia de processamento, coincidindo com a maior acidificação e menores valores de pH dos embutidos (LÜCKE, 2000). TERRA, FRIES, TERRA (2004) observaram maior desenvolvimento dos *Lactobacillus* da cultura *starter* em salame tipo italiano durante os sete primeiros dias de processamento, obtendo valores próximos a 5×10^8 UFC/ g. O número de células viáveis de *Lactobacillus* obtido aos sete dias de processamento para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4 foi $6,1 \times 10^7$, $3,7 \times 10^7$, $7,2 \times 10^8$ e $1,4 \times 10^8$ UFC/ g.

Após 28 dias de processamento obteve-se número de *Lactobacillus* da flora contaminante de 4×10^7 e 5×10^7 UFC/ g e de *Lactobacillus paracasei* $2,7 \times 10^8$ e $2,2 \times 10^8$ UFC/ g para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, verificando-se que a cultura probiótica apresentou elevado número de células viáveis nos embutidos e que a adição do extrato de marcela do campo não afetou seu desenvolvimento (Tratamento 4). Na análise estatística observou-se diferença significativa no nível de 5% para o número de *Lactobacillus* entre os Tratamentos 3 e 4 em relação aos Tratamentos 1 e 2.

As contagens de *Lactobacillus paracasei* aos 28 dias de processamento dos embutidos dos Tratamentos 3 e 4 mostraram-se dentro dos valores de $1,3 \times 10^8$ a $3,5 \times 10^8$ UFC/ g obtidos por PIDCOCK; HEARD; HENRIKSSON (2002) para salame húngaro após 21 dias de maturação, porém após esse período, os referidos autores verificaram redução no crescimento de *L. paracasei* obtendo número de células de $1,6 \times 10^6$ a $5,5 \times 10^7$ UFC/ g no quadragésimo segundo dia de processamento.

As contagens de *Lactobacillus* mostraram-se estáveis durante o período de estocagem, mantendo valores próximos a 10^7 UFC para os Tratamentos 1 e 2 e 10^8 UFC para os Tratamentos 3 e 4. CAMPOS (2002) verificou contagens de *Lactobacillus* inferiores às obtidas para os Tratamentos 1 e 2 ($2,5 \times 10^3$ a $5,6 \times 10^3$ UFC/ g) em salame tipo italiano após 120 dias de armazenamento, porém a conservação das peças foi realizada em ambiente não refrigerado, gerando declínio na população microbiana no decorrer da estocagem.

Após 150 dias de armazenamento, o número de células viáveis de *Lactobacillus paracasei* nos Tratamentos 3 e 4 foi $1,23 \times 10^8$ e $1,83 \times 10^8$ UFC/ g, respectivamente.

Os valores obtidos para a contagem de *L. paracasei* nesses tratamentos mostraram-se superiores à contagem de $1,8 \times 10^7$ UFC/ g verificada por BUNTE; HERTEL; HAMMES (2000) em salame inoculado com a mesma espécie probiótica. Após a ingestão do produto por um grupo de voluntários, os referidos autores observaram que a contagem de *L. paracasei* nas fezes daqueles indivíduos variou de $1,2 \times 10^7$ a $1,5 \times 10^8$ e que a cepa probiótica constituía 5% a 12 % do número total de *Lactobacillus* da flora fecal.

A cultura de *Lactobacillus paracasei* mostrou sobrevivência ao longo da estocagem e manteve sua viabilidade celular em valores acima do recomendado (mínimo 10^6 UFC/ g) para ação probiótica no organismo (ANDERSEN, 1998; FERREIRA, 2003; PAPAMANOLI et al., 2003; TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Para o crescimento de *Pediococcus pentosaceus* da cultura *starter* também foi verificado aumento no número de células viáveis nos primeiros sete dias de processamento, atingindo valores de $3,6 \times 10^7$, $3,1 \times 10^7$, $1,1 \times 10^8$ e $1,3 \times 10^8$ UFC/ g para os Tratamentos 1, 2, 3 e 4. Observou-se que a população de *Pediococcus* mostrou-se maior nos Tratamentos 3 e 4 em relação aos Tratamentos 1 e 2 durante o processamento e a estocagem dos embutidos.

Ao final de 28 dias de fabricação, o número de células de *Pediococcus pentosaceus* no Tratamento 1 foi 8×10^6 UFC/ g, no Tratamento 2, $4,7 \times 10^6$ UFC/ g e nos Tratamentos 3 e 4, $2,4 \times 10^7$ e $1,7 \times 10^7$ UFC/ g, respectivamente, observando-se diferença estatística significativa no nível de 5% entre os Tratamentos 3 e 4 em relação aos Tratamentos 1 e 2. Ao longo do armazenamento, as contagens de *Pediococcus pentosaceus* sofreram leve declínio, finalizando 178 dias de estudo com número de células entre $9,5 \times 10^5$ (Tratamento 2) e $8,5 \times 10^6$ UFC/ g (Tratamento 4).

O crescimento dos *Lactobacillus* e *Pediococcus* promoveu acidificação do meio, com conseqüente redução do pH e decréscimo nos valores de atividade de água, os quais aliados à presença dos sais de cura foram responsáveis pela inibição do crescimento dos microrganismos contaminantes da família *Enterobacteriaceae* nos embutidos fermentados (MONFORT, 2002). O elevado número de bactérias lácticas no salame torna esses microrganismos mais competitivos contra a flora contaminante, contribuindo para o aumento da vida de prateleira do produto (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

Entre os microrganismos da família *Enterobacteriaceae* encontram-se os do grupo coliforme que inclui bactérias pertencentes predominantemente aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, originárias do trato gastrointestinal humano e de animais de sangue quente, mas também pertencentes a algumas espécies não entéricas.

A presença dos coliformes nos alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós-processo ou pós-sanitização, evidenciando práticas de higiene aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001). Dentre os coliformes de habitat reconhecidamente fecal, a *Escherichia coli* é o microrganismo mais conhecido e mais facilmente diferenciado dos membros não fecais, sendo sua presença nos alimentos indicativa de contaminação fecal. De maneira geral, os coliformes são indicadores das condições higiênico-sanitárias e da possível ocorrência de enteropatógenos nos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

As contagens de bactérias do grupo coliforme realizadas no início do processamento (tempo 1) nos embutidos dos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 indicaram valores de $1,9 \times 10^2$, $1,5 \times 10^2$, $1,5 \times 10^2$ e $2,5 \times 10^2$ UFC/ g para coliformes totais e 2×10^1 , $1,5 \times 10^1$, $5,3 \times 10^1$ e $2,5 \times 10^1$ UFC/ g para *Escherichia coli*, respectivamente. Os valores obtidos para a contagem de *Escherichia coli* mostraram-se abaixo do padrão máximo de 1×10^3 UFC/ g exigido pela legislação brasileira para produtos cárneos maturados (BRASIL, 2001) e do limite de 1×10^2 UFC/ g citado por TERRA; FRIES; TERRA (2004) para coliformes fecais em salame tipo italiano.

Após 28 dias de processamento e 150 dias de armazenamento, as determinações de coliformes totais e de *Escherichia coli* mostraram ausência destes microrganismos nos embutidos de todos os tratamentos, tendo seus resultados expressos como $< 1 \times 10^1$ UFC/ g (BRASIL, 2003).

Observando a evolução no número de células de *Staphylococcus xylosus* durante o processamento dos embutidos, verifica-se que os tratamentos que não receberam a adição da cultura de *Lactobacillus paracasei* (Tratamentos 1 e 2) apresentaram maiores contagens em relação aos Tratamentos 3 e 4, mostrando situação semelhante à verificada nos Experimentos 1 e 2. Os resultados obtidos mostraram que a presença da cultura probiótica nos embutidos não afetou o desenvolvimento de *Pediococcus pentasaceus*, porém reduziu o crescimento de *Staphylococcus xylosus* da cultura *starter*.

Partindo-se de número de células viáveis de *Staphylococcus xylosus* de $2,5 \times 10^6$, $6,6 \times 10^6$, 5×10^6 e 8×10^6 UFC/ g nos Tratamentos 1, 2, 3 e 4, verificou-se que durante o processamento dos embutidos, a cultura de *Staphylococcus xylosus* mostrou crescimento nos Tratamentos 1 e 2 até 14 dias de estudo, observando declínio gradual no número de células até o final do período de armazenamento.

Por outro lado, a mesma cultura apresentou pequeno crescimento do número de células viáveis no início do processamento para o Tratamento 4, enquanto que para o Tratamento 3 observou-se redução gradativa na contagem do estafilococo durante o processamento e a estocagem. O menor número de células de *Staphylococcus xylosus* obtido para o embutido do Tratamento 3 no início do processamento poderia ter influenciado sua coloração, que se apresentou mais pálida em relação aos demais tratamentos na avaliação sensorial e da luminosidade das peças (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001). Entre os Tratamentos 3 e 4, as contagens de *Staphylococcus xylosus* deste último mostraram-se superiores para a maioria dos períodos de amostragem avaliados. No entanto, ao final do período de armazenamento, o número de células viáveis do estafilococo nos embutidos adicionados de *L. paracasei* mostraram-se superiores aos obtidos para os Tratamentos 1 e 2.

4.5.3 Avaliação Sensorial

As alterações nas características sensoriais dos embutidos fermentados durante o armazenamento foram verificadas mediante quatro avaliações sensoriais realizadas no início da estocagem (tempo 28), aos 50 dias (tempo 78), 105 dias (tempo 133) e 150 dias de armazenamento (tempo 178) (Tabela 24).

Entre os atributos avaliados, a cor e a textura mostraram as maiores diferenças entre as notas obtidas pelos tratamentos. Houve diferença estatística significativa no nível de 5% entre as médias recebidas para a cor dos embutidos em todos os períodos de estocagem avaliados e para a textura nos períodos de tempo 28 dias, 78 dias e 133 dias.

O Tratamento 4 (*L. paracasei* + extrato de marcela do campo) apresentou as maiores pontuações para a cor durante todos os tempos de armazenamento e para a textura, nos tempos 28 dias, 78 dias e 178 dias, recebendo pontuação inferior à do Tratamento 1 (controle) somente para o tempo 133 dias. Contudo, para esse período, a nota recebida pelo Tratamento 4 (6,77) não mostrou diferença significativa em relação à nota atribuída ao Tratamento 1 (6,88). Para ambos os atributos, o Tratamento controle exibiu pontuações superiores às dos Tratamentos 2 e 3, sendo que esse último recebeu as menores notas.

TABELA 24 – MÉDIAS DAS NOTAS OBTIDAS NAS AVALIAÇÕES SENSORIAIS REALIZADAS APÓS O PROCESSAMENTO E DURANTE O ARMAZENAMENTO DOS EMBUTIDOS - EXPERIMENTO 3

ATRIBUTOS	PERÍODOS DE AVALIAÇÃO	TRAT. 1	TRAT. 2	TRAT. 3	TRAT. 4
Gosto ácido	Tempo 28 dias	6,5 ^{ab}	6,05 ^{ab}	6,88 ^a	5,61 ^b
	Tempo 78 dias	5,83 ^a	5,88 ^a	6,11 ^a	5,27 ^a
	Tempo 133 dias	6,33 ^a	6,94 ^a	6,27 ^a	6,22 ^a
	Tempo 178 dias	5,77 ^a	6,38 ^a	5,8 ^a	5,5 ^a
Sabor	Tempo 28 dias	6,88 ^a	6,33 ^a	4,88 ^b	7,22 ^a
	Tempo 78 dias	6,72 ^{ab}	7,05 ^a	5,77 ^b	6,88 ^{ab}
	Tempo 133 dias	6,22 ^a	6,61 ^a	5,66 ^a	6,5 ^a
	Tempo 178 dias	6,94 ^a	6,83 ^a	5,83 ^a	7,16 ^a
Aroma	Tempo 28 dias	6,72 ^a	6,61 ^a	5,72 ^a	6,88 ^a
	Tempo 78 dias	7,00 ^a	6,88 ^a	4,22 ^b	5,77 ^a
	Tempo 133 dias	7,00 ^a	6,94 ^a	5,94 ^a	6,38 ^a
	Tempo 178 dias	6,61 ^a	6,72 ^a	5,77 ^a	6,22 ^a
Cor	Tempo 28 dias	6,61 ^a	6,16 ^b	4,66 ^c	7,83 ^a
	Tempo 78 dias	6,88 ^a	6,16 ^a	4,11 ^b	7,44 ^a
	Tempo 133 dias	7,00 ^a	6,50 ^a	4,61 ^b	7,16 ^a
	Tempo 178 dias	6,83 ^{ab}	5,88 ^{ab}	5,38 ^b	7,27 ^a
Textura	Tempo 28 dias	6,66 ^b	6,38 ^b	4,38 ^c	7,88 ^a
	Tempo 78 dias	6,88 ^a	5,33 ^{ab}	3,77 ^b	6,94 ^a
	Tempo 133 dias	6,88 ^a	5,55 ^{ab}	4,55 ^b	6,77 ^a
	Tempo 178 dias	6,22 ^a	5,94 ^a	4,83 ^a	6,27 ^a
Aspecto	Tempo 28 dias	6,33 ^{ab}	6,38 ^{ab}	5,44 ^b	7,27 ^a
	Tempo 78 dias	7,05 ^a	7,11 ^a	4,66 ^b	6,77 ^a
	Tempo 133 dias	6,72 ^a	7,05 ^a	6,33 ^a	7,11 ^a
	Tempo 178 dias	6,5 ^a	7,38 ^a	6,72 ^a	7,72 ^a

Médias seguidas das mesmas letras na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey no nível de 5%.

Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *starter* + extrato antioxidante de marcela do campo; Tratamento 3: *starter* + *Lactobacillus paracasei*; Tratamento 4: *starter* + *Lactobacillus paracasei* + extrato antioxidante de marcela do campo

A maior luminosidade mostrada pelos embutidos do Tratamento 3 (*L. paracasei*) na determinação instrumental do croma L^* influenciou a cor das amostras na avaliação sensorial, sendo identificada pelos provadores como mais clara em relação aos demais tratamentos. Tendo-se como cor tradicional dos salames o vermelho escuro, colorações mais pálidas tendem a ser menos preferidas pelos degustadores e recebem menores pontuações.

A textura menos firme apresentada pelos embutidos do Tratamento 3 pode ser atribuída aos maiores teores de umidade e atividade de água e menores teores de proteínas encontrados após processamento e armazenamento, pois essa condição reduz a quantidade de proteínas miofibrilares no estado gel que influenciam a firmeza do produto.

O menor teor protéico nos produtos cárneos também reduz a quantidade de mioglobina disponível para a reação de cor, gerando produtos com coloração menos intensa (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

Para o gosto ácido verificou-se maiores escores nos tempos 28 e 78 dias para o Tratamento 3 e para o Tratamento 2 (extrato de marcela do campo) nos tempos 133 e 178 dias, enquanto que o Tratamento 4 apresentou as menores pontuações em todas as avaliações realizadas, mostrando menor acidez ao paladar, característica preferida pelo consumidor brasileiro para os salames (FROSI, 2002).

O *flavor* dos salames compreende as sensações de sabor e aroma e é produzido mediante um complexo processo do qual participam a fermentação dos carboidratos, proteólise, lipólise, oxidação lipídica, condimentos e sais de cura (TERRA, 2003).

O papel desempenhado pela lipólise é de fundamental importância, tendo em vista que os ácidos graxos liberados servem de substrato para as mudanças oxidativas responsáveis pelo desenvolvimento do aroma (TERRA, 2003). ZANARDI et al. (2004) descrevem que cerca de 70% da lipólise ocorrida nos produtos cárneos durante a maturação é causada pela ação de enzimas da própria carne, às quais também é atribuída grande parte da proteólise verificada nos salames. Estudos mostraram a ação proteolítica da enzima tissular cathepsina D sobre a degradação de 50% e 80% das proteínas miofibrilares actina e miosina, respectivamente, no salame, demonstrando que as enzimas endógenas da carne desempenham papel crucial no desenvolvimento do *flavor*, apesar das evidências de que as proteases bacterianas também atuam no sabor e aroma desses produtos (HAMMES; HERTEL, 1998; ZANARDI et al., 2004).

Nas avaliações sensoriais dos embutidos ao longo do período de estocagem não foi verificada influência positiva ou negativa de cultura de *Lactobacillus paracasei* sobre o sabor e o aroma dos produtos, pois o Tratamento 3 mostrou as menores pontuações para o sabor e aroma em todos os períodos de armazenamento, porém o Tratamento 4 apresentou as maiores notas para o sabor nos tempos 28 e 178 dias e para o aroma no tempo 28 dias. Para os demais períodos de amostragem, os escores de sabor e aroma recebidos pelo Tratamento 4 não apresentaram diferença estatística significativa no nível de 5% em relação às notas dos Tratamentos 1 e 2.

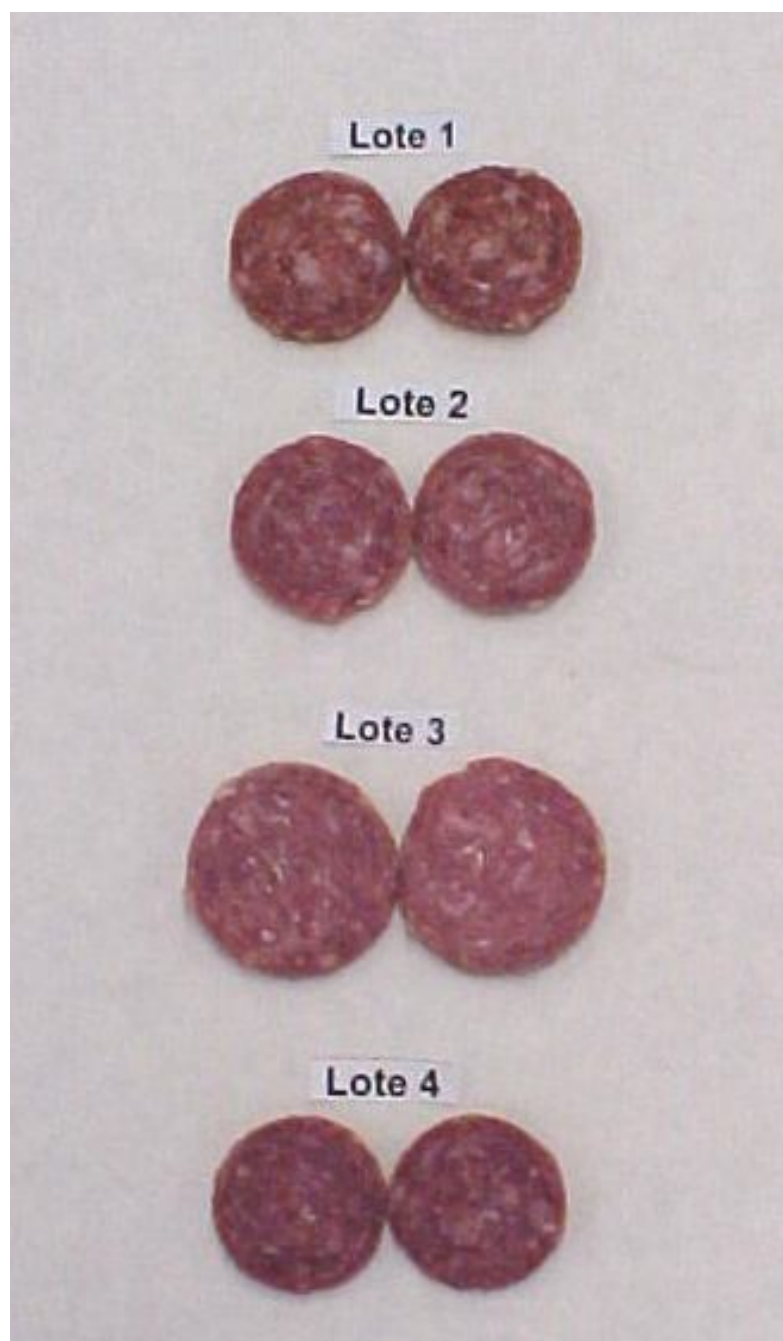
O atributo de aspecto ou aparência concebe a idéia geral do produto avaliado, unindo as características de cor, sabor, aroma, textura e acidez (TERRA; FRIES; TERRA, 2004). Os embutidos do Tratamento 4 receberam as maiores pontuações para o aspecto após o processamento (28 dias), 105 dias (tempo 133 dias) e 150 dias de armazenamento (tempo 178 dias). Para o tempo 78 dias, o Tratamento 2 mostrou melhor aparência, contudo não houve diferença estatística entre a pontuação recebida por esse tratamento e as pontuações obtidas pelos Tratamentos 1 e 4. As fatias dos embutidos do Tratamento 3 mostraram maior diâmetro ao final de 150 dias de estocagem, devido à menor perda de água durante o processamento como mostra a Figura 25.

Considerando os resultados obtidos nas avaliações sensoriais, verificou-se que, de maneira geral, os embutidos do Tratamento 4 (*L. paracasei* + extrato de marcela do campo) foram preferidos pelos provadores, recebendo as maiores pontuações em todos os atributos avaliados ao final do processamento (tempo 28 dias) e ao final do armazenamento (tempo 178 dias), com exceção do aroma nesse último período de avaliação.

A adição conjunta da cultura de *Lactobacillus paracasei* e do extrato de marcela do campo aos embutidos mostrou o melhor perfil sensorial entre os tratamentos testados, porém a adição isolada desses componentes não apresentou melhoria nas características sensoriais dos embutidos em relação ao tratamento controle.

Ao final de 150 dias de armazenamento refrigerado, todos os tratamentos receberam pontuações médias acima de 6,5 para a aparência geral, demonstrando estabilidade sensorial durante a estocagem e sua apreciação pelos provadores em uma escala de nota máxima de nove pontos.

FIGURA 25 – ASPECTO DAS FATIAS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS DOS TRATAMENTOS 1, 2, 3 E 4 APÓS 150 DIAS DE ARMAZENAMENTO REFRIGERADO (TEMPO 178) – EXPERIMENTO 3



Tratamento 1: controle (*starter*); Tratamento 2: *starter* + extrato antioxidante de marcela do campo; Tratamento 3: *starter* + *Lactobacillus paracasei*; Tratamento 4: *starter* + *Lactobacillus paracasei*+ extrato antioxidante de marcela do campo

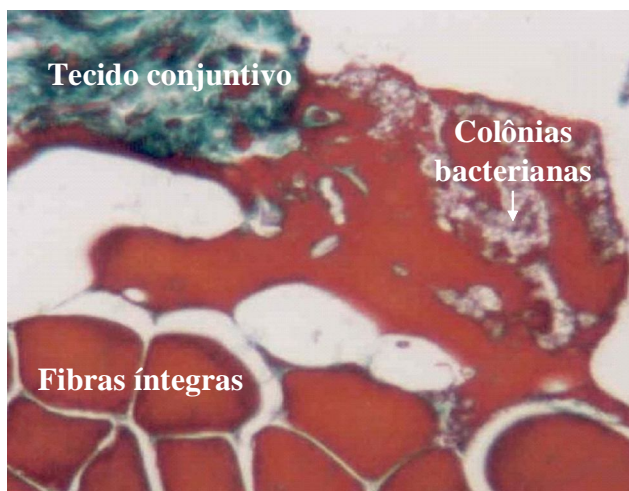
A proteólise que tem início durante a fermentação do salame e persiste ao longo de seu armazenamento, consiste em um dos fatores responsáveis pela textura, sabor e aroma dos embutidos, pois promove a lise das proteínas, liberando aminoácidos livres e peptídeos que são posteriormente convertidos em aldeídos, ácidos, álcoois e ésteres (TERRA; FRIES; TERRA, 2004). Durante a proteólise, a enzima catepsina D, de origem muscular, degrada a miosina conduzindo à perda da banda estriada típica da miofibrila da carne e causando modificações na estrutura das fibras musculares (HAMMES; HERTEL, 1998; ZANARDI et al., 2004).

Algumas dessas alterações estruturais nas fibras musculares podem ser identificadas mediante a visualização de cortes histológicos corados dos embutidos cárneos. A Figura 26 mostra microfotografias de fragmentos dos embutidos fermentados após 150 dias de armazenamento corados pelos corantes tricrômico de Shorr e tricrômico de Mallory, tradicionalmente empregados na coloração de tecidos animais. Para o emprego das colorações, os fragmentos foram fixados em solução de formol a 10% por 24 horas e processados segundo a rotina histopatológica de desidratação, diafanização e inclusão dos fragmentos em parafina, para posterior corte com espessura de 3 μm . As colorações tricrômicas de Shorr e de Mallory são utilizadas para diferenciar o tecido muscular do tecido conjuntivo, permitindo evidenciar alterações em sua morfologia (MAIA, 1979).

Pela Figura 26 pode-se verificar que os fragmentos de embutidos apresentam regiões de fibras musculares íntegras em corte transversal dos tecidos, presença de tecido conectivo e tecido adiposo. A proteólise é evidenciada pela existência de fibras musculares dissolvidas, com perda das estriações transversais, características do músculo esquelético. Além disso, também podem ser visualizadas colônias bacterianas, as quais possivelmente pertencem ao grupo das bactérias lácticas, devido à sua alta contagem nos embutidos, mostrando que esses microrganismos mantiveram-se presentes nos produtos até o final do período de armazenamento.

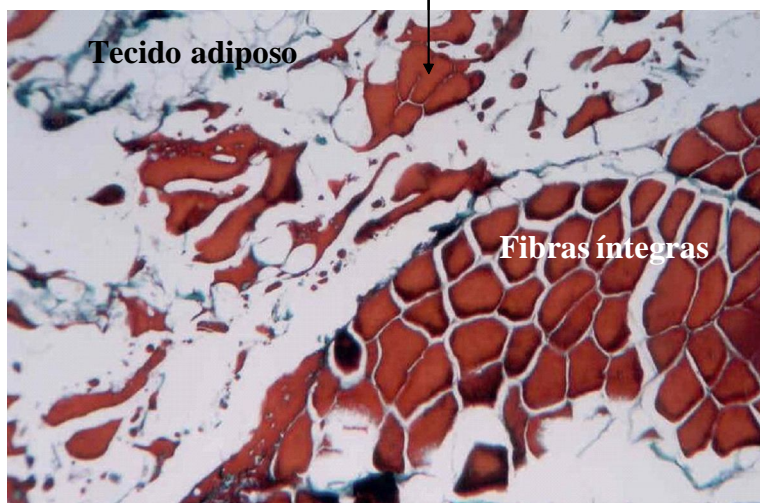
FIGURA 26 – CORTES HISTOLÓGICOS DE FRAGMENTOS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS APÓS 150 DIAS DE ARMAZENAMENTO CORADOS PELAS TÉCNICAS DE TRICRÔMICO DE SHORR (1 E 2) E TRICRÔMICO DE MALLORY (3) - MICROFOTOGRAFIAS DE TRANSMISSÃO DE LUZ (FOTO 1 - 40 X, FOTO 2 - 10 X E FOTO 3 - 10 X)

1



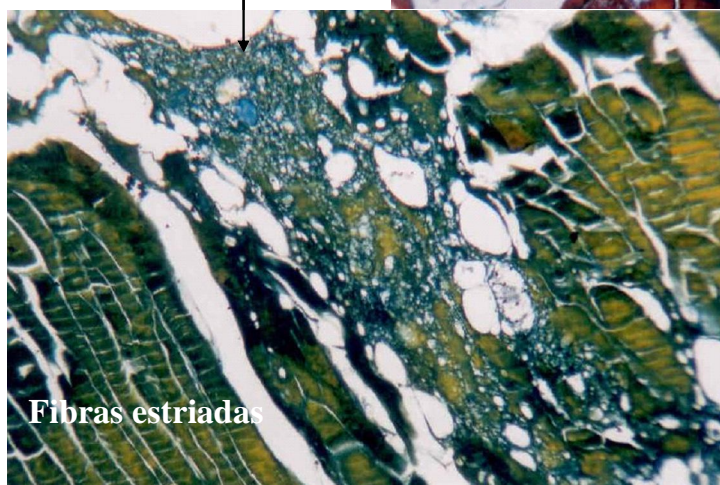
Proteólise

2



3

Proteólise



4.6 RESISTÊNCIA DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* AO BAIXO pH E NA PRESENÇA DE SAIS BILIARES

4.6.1 Capacidade de Resistência ao Baixo pH

A tolerância à acidez e à bile constituem duas propriedades fundamentais que indicam a habilidade de um microrganismo probiótico em sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal, resistindo às condições ácidas do estômago e aos sais biliares na porção inicial do intestino delgado (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; ANNUK, et al., 2003).

PENNACCHIA et al. (2004) relatam que a sobrevivência dos lactobacilos em solução salina ácida é ligeiramente menor do que no suco gástrico devido à ação protetora exercida por alguns componentes do suco gástrico sobre as células bacterianas. Considerando a solução salina ácida como um ambiente mais deletério às bactérias do que o próprio suco gástrico, os referidos autores indicam seu uso para a seleção de culturas probióticas resistentes à passagem pelo estômago.

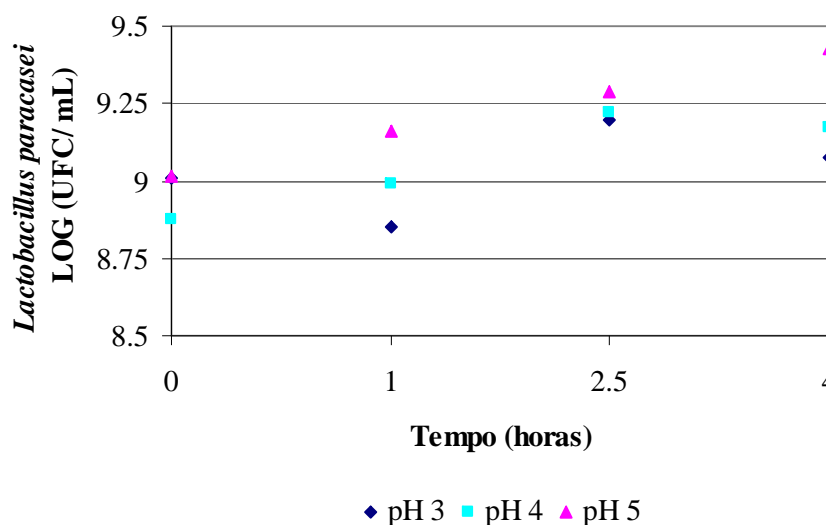
O número de células viáveis de *Lactobacillus paracasei* em solução salina com pH 3, 4 e 5 ao longo de 4 horas de exposição está apresentado na Figura 27.

Observou-se aumento na contagem total de *Lactobacillus paracasei* após 4 horas de exposição à solução salina nos diferentes valores de pH. O número inicial de células de *L. paracasei* observado para as soluções ajustadas aos valores de pH 3, 4, e 5 foi 1×10^9 , $7,5 \times 10^8$ e 1×10^9 UFC/ mL, respectivamente, não havendo diferença estatística significativa no nível de 5% para os diferentes valores de pH.

Após 1 hora de exposição à solução salina, houve pequena redução do número de células de *L. paracasei* somente em pH 3 ($7,2 \times 10^8$ UFC/ mL), enquanto que para os demais valores de pH, o lactobacilo mostrou incremento na contagem celular até 2,5 horas de exposição.

As contagens de *L. paracasei* após 4 horas em meio ácido mostraram que em pH 5 a cepa apresentou aumento gradativo no número de células, ao passo que para os valores de pH 3 e 4 houve ligeira redução no número de células em comparação ao período de 2,5 horas.

FIGURA 27 – SOBREVIVÊNCIA DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* DURANTE 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO EM SOLUÇÃO SALINA ÁCIDA A 37° C



No entanto, o número final de células viáveis após 4 horas de exposição à solução salina para os valores de pH 3 e 4 mostrou-se superior ao número de células viáveis observado logo após a inoculação do meio. Ao final do período de 4 horas de exposição à solução salina ácida, as contagens obtidas para *L. paracasei* em pH 3, 4 e 5 foram $1,2 \times 10^9$, $1,5 \times 10^9$ e $2,7 \times 10^9$ UFC/ mL, respectivamente, verificando-se diferença significativa entre o número de células viáveis nos diferentes valores de pH.

ERKKILÄ; PETÄJÄ (2000) verificaram a resistência de algumas cepas de *Lactobacillus pentosus*, *L. sakei*, *Pediococcus pentosaceus* e *P. acidilactici* ao baixo pH e observaram que em pH 4 e pH 5, o número de células viáveis permaneceu inalterado quando comparado ao seu valor inicial, mostrando que o crescimento das culturas não foi afetado pelo baixo pH.

No momento da excreção do ácido clorídrico, o pH estomacal é de 0,9, contudo, durante o processo digestivo esse pH sofre aumento devido à presença de alimentos que elevam seu valor para níveis próximos de 3 e que permanecem nessas condições por um período de 2 a 4 horas (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Considerando as condições de pH e tempo de digestão, as bactérias probióticas ingeridas juntamente com os alimentos devem ser capazes de resistir ao valor de pH 3 por um período de 2 a 4 horas para permitir sua sobrevivência durante ao trânsito gástrico. A cultura de *Lactobacillus paracasei* testada mostrou-se capaz de resistir e crescer em ambiente com pH 3, exibindo aumento de 20% em relação ao número inicial de células durante o período de 4 horas de exposição a essa condição ácida.

PENNACCHIA et al. (2004) testaram a resistência de culturas de *Lactobacillus* isoladas de dez diferentes tipos de salame ao baixo pH e verificaram que do total de catorze bactérias lácticas que mostraram sobrevivência em pH 2,5 por 3 horas, cinco pertenciam às espécies que compõem o grupo *Lactobacillus casei*. Os referidos autores citam ainda estudos sobre a resistência à acidez utilizando 20 culturas de *Lactobacillus* isoladas de fezes de lactentes, para as quais verificou-se que três cepas de *L. paracasei* e uma de *L. rhamnosus* mantiveram seu crescimento inalterado frente aos baixos valores de pH.

4.6.2 Capacidade de Resistência aos Sais Biliares

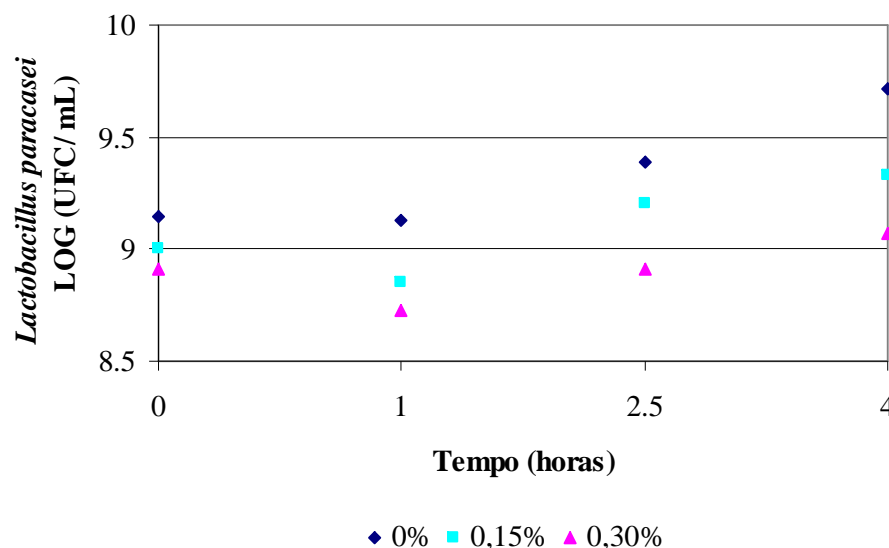
A bile exerce importante papel no mecanismo de defesa intestinal e a intensidade de sua ação inibitória sobre os microrganismos é determinada pela concentração de sais biliares em sua composição (CHARTERIS et al., 2000). Os sais biliares atuam destruindo a camada lipídica e os ácidos graxos da membrana celular dos microrganismos. Porém, alguns *Lactobacillus* são capazes de hidrolisar os sais biliares pela produção da enzima sais biliares hidrolase enfraquecendo o poder detergente da bile (PAPAMANOLI et al., 2003).

O efeito dos sais biliares sobre o crescimento de *Lactobacillus paracasei* durante o período de 4 horas de exposição está apresentado na Figura 28.

A cepa de *Lactobacillus paracasei* mostrou sobrevivência nas concentrações de 0,15% e 0,30% de sais biliares, apresentando aumento no número de células viáveis a partir de 2,5 horas de exposição ao meio.

Partindo-se do número inicial de células de $1,4 \times 10^9$, 1×10^9 e $8,1 \times 10^8$ UFC/ mL no teste controle (0%) e nas concentrações de 0,15% e 0,30% de sais biliares, respectivamente, verificou-se que na primeira hora de exposição houve redução no número de células de *L. paracasei* para as concentrações testadas, embora a redução para o meio sem adição de sais biliares tenha sido menor do que aquela apresentada para as demais concentrações.

FIGURA 28 – CRESCIMENTO DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* EM CALDO MRS CONTENDO 0%, 0,15% E 0,30% DE SAIS BILIARES DURANTE 4 HORAS DE EXPOSIÇÃO A 37° C



A redução no crescimento de *L. paracasei* pode ser devido ao período de adaptação (fase lag de crescimento) da cultura ao meio (CARVALHO, 1999), que se mostrou maior para as concentrações mais elevadas de sais biliares. PENNACCHIA et al. (2004) encontraram resultados semelhantes ao testar 28 cepas de *Lactobacillus* isoladas de diferentes tipos de salame de origem italiana em caldo MRS suplementado com 0,3% de sais biliares, mostrando que 27 cepas apresentaram aumento da fase lag de crescimento nas primeiras horas após exposição ao meio.

A partir do período de 2,5 horas de exposição, observou-se contagens crescentes para o número de células viáveis de *L. paracasei* em todas as concentrações de sais biliares, atingindo contagens de $5,2 \times 10^9$, $2,1 \times 10^9$ e $1,2 \times 10^9$ UFC/ mL após 4 horas de exposição para as concentrações de 0%, 0,15% e 0,30%, respectivamente. Na análise estatística verificou-se diferença significativa no nível de 5% para o número de células viáveis de *L. paracasei* nas concentrações de sais biliares testadas após 4 horas de exposição.

Embora tenha sido verificada diferença significativa para o crescimento de *Lactobacillus paracasei* entre as concentrações de sais biliares utilizadas, a cepa bacteriana mostrou resistência à presença de 0,3% de sais biliares em caldo MRS com pH 5,6, apresentando aumento de 48% no número de células viáveis em relação à contagem inicial após 4 horas de exposição.

De acordo com ERKKILÄ; PETAJA (2000) e PENNACCHIA et al. (2004), a concentração média de sais biliares no trato intestinal humano é de 0,3%, sendo essa a concentração crítica utilizada para a seleção de bactérias resistentes à ação da bile.

ERKKILÄ; PETAJA (2000) observaram redução de um ciclo logarítmico no número inicial de células viáveis de *Lactobacillus curvatus* e *Pediococcus acidilactici*, bactérias lácticas usadas como culturas *starter* de salame, quando inoculadas em meio contendo 0,3% de sais biliares e pH 6 após 4 horas de exposição.

PAPAMANOLI et al. (2003) consideram tolerância aos sais biliares quando uma população de bactérias com número de células viáveis de 10^6 a 10^7 UFC/ mL é reduzida para no máximo 10^5 UFC/ mL durante um período de 4 horas.

BUNTE; HERTEL; HAMMES (2000) verificaram alta resistência ao baixo pH e à concentração biliar normalmente encontrada no trato intestinal humano de cepa de *Lactobacillus paracasei* isolada de purê de frutas, enquanto SAMESHIMA et al. (1998) observaram a resistência de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* isoladas do trato intestinal humano ao suco gástrico e à bile.

De um total de 63 cepas bacterianas isoladas de embutidos fermentados, peixe em conserva, massa de panificação e purê de frutas, nove cepas de *Lactobacillus* foram capazes de resistir ao pH 2,5 e somente *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* mostraram sobrevivência em pH 2 e à bile (HALLER et al., 1997).

Pelos resultados obtidos verificou-se que a cepa de *Lactobacillus paracasei* mostrou capacidade de crescer em solução salina com baixos valores de pH e em caldo MRS suplementado com 0,3% de sais biliares, o que pode indicar sua resistência à acidez estomacal e à ação da bile no intestino. Durante o processamento dos embutidos cárneos, os lactobacilos adicionados à massa são encapsulados pela matriz cárnea composta de carne e gordura. Devido a essa proteção exercida pelo alimento, a sobrevivência dos lactobacilos *in vivo* durante a passagem pelo estômago e intestino mostra-se maior do que aquela verificada *in vitro* pela exposição isolada dos microrganismos ao baixo pH e aos sais biliares (ERKKILÄ; PETAJA, 2000).

5 CONCLUSÃO

As culturas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* testadas apresentaram resistência à adição concomitante de 3% de cloreto de sódio e 200 ppm de nitrito de sódio em meio de cultura, permitindo sua utilização como culturas probióticas em produtos cárneos curados.

A suplementação de tetraciclina ao ágar MRS na concentração de 10 mg/ L promoveu o crescimento seletivo de *Pediococcus pentosaceus*, possibilitando a contagem isolada dessa bactéria láctica da cultura *starter* e a enumeração dos *Lactobacillus* probióticos adicionados aos embutidos cárneos.

Os embutidos que receberam a adição das culturas de *Lactobacillus* mostraram redução mais rápida do pH durante o processamento, devido à atividade fermentativa desses microrganismos associada à acidificação gerada pelas bactérias lácticas da cultura *starter*.

A presença de *Lactobacillus rhamnosus* intensificou o gosto ácido dos embutidos, tornando seu sabor menos apreciado e de menor preferência na avaliação sensorial.

A adição de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* aos embutidos provocou redução no desenvolvimento de *Staphylococcus xylosus*, tornando a cor dos produtos mais clara e de tonalidade avermelhada menos intensa. Por outro lado, a presença das culturas probióticas não interferiu no crescimento de *Pediococcus pentosaceus* que, para a maioria dos períodos de avaliação, mostrou melhor desenvolvimento quando em conjunto com os *Lactobacillus*.

A cepa de *Lactobacillus paracasei* demonstrou maior capacidade de crescer no meio cárneo, apresentando melhor viabilidade celular durante os períodos de processamento e armazenamento dos embutidos em comparação à cultura de *Lactobacillus casei*.

A ação do extrato hidroetanólico de marcela do campo na redução da oxidação dos lipídeos foi verificada somente nos embutidos que receberam a adição concomitante do extrato vegetal e de *Lactobacillus paracasei*, porém não foi constatada diminuição dos valores de TBA nos embutidos que receberam o antioxidante natural isoladamente.

Os embutidos adicionados de *Lactobacillus paracasei* e extrato de marcela do campo exibiram o melhor perfil sensorial entre os tratamentos testados, mostrando estabilidade sensorial e a preferência dos provadores durante o armazenamento.

O uso do extrato hidroetanólico de marcela do campo não influenciou o desenvolvimento de *Lactobacillus paracasei* que manteve-se estável nos embutidos durante o armazenamento, apresentando número de células superior a 10^8 UFC/ g ao final de 150 dias de estocagem sob refrigeração.

Comprovou-se a capacidade de crescimento de *Lactobacillus paracasei* em meio com pH 3,0 e concentração de 0,3% de sais biliares por um período de 4 horas, indicando a possibilidade de sua sobrevivência durante o trânsito gastrintestinal.

Ficou demonstrada a viabilidade da utilização de culturas probióticas de *Lactobacillus* em embutido cárneo fermentado, preservando as características de qualidade do produto.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, A. M. Bio: La nueva generación de productos lácteos. **Alimentaria**, Madrid, n. 192, p. 103-105, mayo 1988.

ANDERSEN, L. Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures. In: 44th. International Commitment of Meat Science and Technology (1998: Barcelona). **Anais**. Barcelona: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, 1998. p. 826-827.

ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 403-412, 2003.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17. ed. Gaithersburg, v. 1, 2000.

ARIHARA, K.; OTA, H.; ITOH, M.; KONDO, Y.; SAMESHIMA, T.; YAMANAKA, H. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 544-547, 1998.

ARIHARA, K.; ITOH, M. UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 227-230, 2000.

ATCC. American Type Culture Collection. The Global Bioresource Center. **Product Description**. Disponível em: <<http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm>> Acesso em: 20 abr. 2005.

BARRETO, N. S. E.; VIEIRA, R. H. S. F.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, M. E. C. Aplicação de bacteriocinas nos alimentos: uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 126-127, p. 44-50, 2004.

BEJDER, H. C. Probiotics: today dairy, tomorrow the world. **Danish Dairy & Food Industry**, v. 14, p. 42-43, set. 2004.

BERAQUET, N. J. Embutidos fermentados. **Princípios do processamento de embutidos cárneos**. Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes (CTC-ITAL), maio, p. 147-159, 2005.

BORBA, L. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Probióticos em bancos de leite humano. In: **Prébióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 2003. 206 p.

BORGIO, L. A.; ARAÚJO, W. M. C. Mecanismos dos processos de oxidação lipídica. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 130, p. 50-58, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento . Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº. 22 de 31 de julho de 2000. Aprova o Regulamentos Técnicos de Identidade de Qualidade de Salames. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 15-28, 03 de agosto de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico de Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 de janeiro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 55 de 07 de julho de 2003. Altera o subitem nº 4.2.2, dos anexos V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII e XIII, da Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000, referente aos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Salames. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 28, 08 de julho de 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 14, 18 de setembro de 2003b.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. **Biology of microorganisms**. New York: Prentice-Hall, p.392-395, 1991.

BROD, F. C. A.; SAWITZKI, M. C.; FIORENTINI, A. M. Isolamento e caracterização de bactérias ácido lácticas de produtos cárneos artesanais. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (2002: Porto Alegre). **Anais**. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p. 498-501.

BUNTE, C.; HERTEL, C.; HAMMES, W. P. Monitoring and survival of *Lactobacillus paracasei* LTH 2579 in food and the human intestine tract. **Systematic Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 260-266, 2000.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 131-149, 1999.

CAMPBELL-PLATT, G. Fermented meats - a world perspective. In: CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P. E. **Fermented Meats**. Glasgow: Chapman & Hall, 1995, p. 39-53.

CAMPOS, R. M. L. **Influência da alimentação na qualidade da carcaça suína e do pernil para a fabricação do salame tipo italiano**. Santa Maria, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria.

CANHOS, A. L.; DIAS, E. L. **Tecnologia de Carne Bovina e Produtos Derivados**. Campinas: ITAL, 1985. 440 p.

CARLOS, I. Z.; VENDRAMINI, A. P.; VENDRAMINI, R. C.; DÂMASO, A. R.; ROSSI, E. A. Influência de nutrientes no sistema imune: papel das citocinas, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. In: **Prébióticos e Probióticos: Atualização e Prospeção**. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 2003. 206 p.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CARVALHO, E. P. **Microbiologia de alimentos**. Lavras: UFLA/ FAEPE, 1999. 76 p.

CAVENAGHI, A. D.; OLIVEIRA, M. N. Influência de algumas características físico-químicas e sensoriais na qualidade do salame tipo italiano fabricado no Brasil. **Revista Nacional da Carne**, n. 263, p. 44-47, 1999.

CHAGAS, S. S. **Redução do tempo de fabricação do salame tipo italiano**. Santa Maria, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* isolates. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 10, p. 1369-1376, 2000.

CHATEAU, N.; CASTELLANOS, I.; DESCHAMPS, A. M. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, p. 42-44, 1994.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1993.

CHR HANSEN. **Bactoferm T-SPX Cultura Tradicional**. Valinhos: CHR HANSEN Indústria e Comércio Ltda., 2003. Especificação do produto.

CICHOSKI; A. J. **Desenvolvimento de paleta suína curada maturada e fermentada com adição de *Staphylococcus xylosus***. Curitiba, 2004. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná.

CICHOSKI; A. J.; TERRA, N. N. Lipólise e a qualidade sensorial dos produtos cárneos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 85, p. 36-40, 2001.

CICHOSKI; A. J.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Teoria dos obstáculos (hurdle technology) em produtos cárneos curados. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116-117, p. 33-36, 2004.

COELHO, H. S.; SANTANA, A. M.; TERRA, N. N.; MORANDINI, L. M. B. Características físico-químicas do salame tipo italiano contendo couro suíno cozido. **Revista Nacional da Carne**, n. 278, p. 84-96, abr. 2000.

COLLINS, E. B.; HALL, B. J. Growth of bifidobacteria in milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, n. 67, p. 1376-1380, 1984.

COLLINS, M. D.; PHILLIPS, B. A.; ZANONI, P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp *paracasei* and *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 105-108, 1998.

CORETTI, K. **Embutidos: elaboración y defectos**. Zaragoza: Acribia, 1971.

CRACKER, C. C.; PEARSON, A. M.; BOOREN, A. M. CUCKLEY, O. J. Some further observation on the TBA test as an index of lipid in meats. **Journal of Food Chemistry**, p. 187-196, 1988.

De MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

De TONI, C. H.; De TONI Jr, C.; SANT'ANNA, E. S.; OGLIARI, P. J. Uso de bactérias lácticas e seus efeitos nas variações do pH e de nitrito durante a maturação do salame tipo italiano. **Boletim do SBCTA**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 1994.

DICKS, L. M. T.; DU PLESSIS, E. M.; DELLAGLIO, F.; LAUER, E. Reclassification of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 337-340, 1996.

DUTCOSKI, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996. 123 p.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 297-300, 2000.

ERKKILÄ, S; SUIHKO, M. L.; EEROLA, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 205-210, 2001a.

ERKKILÄ, S; PETÄJÄ, E; EEROLA, S.; LILLEBERG, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SUIHKO, M. L. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. **Meat Science**, v. 58, p. 111-116, 2001b.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados**. Aspectos bioquímicos e tecnológicos. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1987.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 2003. 206 p.

FORREST, J. C.; ABERLE, E. D.; HEDRICK, H. B.; JUDGE, M. D.; MERKEL, R. A. **Fundamentos de Ciencia de la Carne**. Zaragoza: Acribia, p. 163-197, 1979.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FRANCO, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

FROSI, V. Nível tecnológico da produção de fermentados no Brasil. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (2002: Porto Alegre). **Anais**. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p. 3915-3917.

FURTADO, A. S.; CAMPAGNOL, P. C. B.; MILANI, L. I. G.; TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M. Atividade antioxidante do extrato de *Achyrocline satureioides* (marcela) em lingüiça. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (2004: Recife). **Anais**. Recife: SBCTA, 2004.

GARCIA, F. T.; GAGLEAZZI, U. A.; SOBRAL, P. J. A. Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante secagem e fermentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 151-158, 2000.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (USP), 1990.

GOULET, J. Propriedades de los productos lacteos fermentados. In: AMIOJ, J. **Ciencia y tecnologia de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 361-364.

GLUCK, U.; GEBBERS, J. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and beta-hemolytic streptococci). **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 77, n. 2, p. 517-520, 2003.

HALLER, D.; SCHERENBACHER, P.; BODE, C.; HAMMES, W. P. Selection of potentially probiotic bacteria. **Zeitschrift fuer Ernahrungswissenschaft**, v. 36, n. 1, p. 87, 1997.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Science**, v. 49, p. 125-138, 1998.

HEENAN, C. N.; ADAMS, M. C.; HOSKEN, R. W. Growth medium for culturing Probiotics bacteria for applications in vegetarian food products. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 35, p. 171-176, 2002.

HICKEY, R. Novel genetic tools for improving food cultures. **Farm and Food**, v. 12, n. 1, p. 32-34, 2002.

HIRANO, J.; YOSHIDA, T.; SUGIYAMA, T.; KOIDE, N.; MORI, I.; YOKOCHI, T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 6, p. 405-409, 2003.

HUGAS, M.; MONFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 547-554, 1997.

INCZE, K. Dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 49, p. S169-S177, 1998.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. *Bifidobacteria*: Research and development in Japan. **Food Technology**, p. 128-135, Jun. 1993.

ISHIBASHI, N. Safety of probiotics. **The World of Food Ingredients**, p. 28-32, Oct./Nov. 2002.

IWATA, M.; MORISHITA, T. The presence of plasmids in *Bifidobacterium breve*. **Applied Microbiology**, v. 9, p. 165-168, 1989.

JAY, J. **Microbiología Moderna de los Alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1994. p. 804.

JAHREIS, G.; VOGELSANG, H.; KIESSLING, G.; SCHUBERT, R.; BUNTE, C.; HAMMES, W. P. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of health volunteers. **Food Research International**, v. 35, p. 133-138, 2002.

JESSEN, B. Starter cultures for meat fermentation. In: CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P. E. **Fermented Meats**. Glasgow: Chapman & Hall, 1995, p. 130-160.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins, 1986. v. 2.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 39-86, 1993.

KLAVER, F. A. M.; KINGMA, F.; WEERKAMP, A. H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 27, p. 151-164, 1993.

KLAVER, F. A. M.; VAN DER MEER, R. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. **Applied Environment Microbiology**, v. 59, p. 1120-1124, 1993.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 103-125, 1998.

KRÖCKEL, L. Bacterial fermentation of meats. In: CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P. E. **Fermented Meats**. Glasgow: Chapman & Hall, 1995, p. 69-110.

LABORCLIN. **Tabela de sensibilidade dos discos de antibióticos**. 3. ed. Pinhais: Laborclin Produtos para Laboratório, 2003. Ficha para interpretação dos resultados (monodiscos e polidiscos de antibióticos Laborclin).

LEMOS, A. L. S. C. Ingredientes e aditivos no processamento de embutidos. **Princípios do processamento de embutidos cárneos**. Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes (CTC-ITAL), maio, p. 11-27, 2005.

LIZASCO, G.; CHASCO, J.; BERIAIN, M. J. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. **Food Microbiology**, v. 16, p.219-228, 1999.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, p. 105-115, 2000.

MAHONEY, M.; HENRIKSSON, A. The effect of processed meat and meat starter cultures on gastrointestinal colonization and virulence of *Listeria monocytogenes* in mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 255-261, 2003.

MAIA, V. **Técnica histológica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1979. 264 p.

MARTINI, M. C.; LEREBOURS, E. C.; LIN, W. J.; HARLANDER, S. K.; BERRADA, N. M.; ANTOINE, J. M.; SAVAIANO, D. A. Strain and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect on in vivo lactose digestion. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 1041-1046, 1991.

McCANN, T.; EGAN, T.; WEBER, G. H. Assay procedures for commercial probiotic cultures. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 41-45, 1995.

MELO; E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MILANI, L. I. G.; FRIES, L. L. M.; QUADROS, C. P.; ROSA, C. S.; BIANCHIN, M.; WAGNER, R.; TERRA, N. N. Antioxidantes e antimicrobianos naturais para carne mecanicamente separada de frango. In: 4º. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (2001: Campinas). **Anais**. Campinas: FEA/ UNICAMP, 2001. p. 122.

MILANI, L. I. G.; WAGNER, R.; QUADROS, C. P.; BIANCHIN, M.; KUBOTA, E.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Inibição natural da oxidação lipídica na carne mecanicamente separada de frango. In: XVIII Congresso de Ciência e Tecnologia de Alimentos (2002: Porto Alegre). **Anais**. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p. 651-654.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutrition Reviews**, v. 50, p. 438-446, 1992.

MONFORT, J. M. Los productos carnicos crudos curados. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (2002: Porto Alegre). **Anais**. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p. 3984-3992.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial de alimentos**. 7. ed. Campinas: UNICAMP, 1990.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998. 150 p.

NASSU, R. T.; BESERRA, F. J.; GONÇALVES, L. A. G. Processo Agroindustrial: obtenção de embutido fermentado tipo salame de carne de caprinos. **Comunicado Técnico**, Fortaleza, EMBRAPA, n. 74, dez. 2002.

NESTLÉ. **Prebiótico, probiótico e imunidade**. [s.l.]:[s.n.], 2004 (Alimentos e Nutrição - Nestlé Nutrition SBD - Comunicações de Nutrição Nestlé).

NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C.; PENNA, F. J.; VIEIRA, L. Q.; RODRIGUES, A. C. P.; NEUMANN, E.; SILVA, A. M.; LIMA FILHO, J. V. M.; BAMBIRRA, E. A.; ARANTES, R. M. E.; MACHADO, D. C. C. Probióticos: Experimentos com animais gnotobióticos. In: **Prébióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 2003. 206 p.

NÚCLEO DE INTELIGÊNCIA COMPETITIVA (NIC)/ PARQUE TECNOLÓGICO DE LONDRINA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Disponível em: <<http://www.londrinatecnopolis.org.br/parque/nic>> Acesso em: 13 abr. 2005.

O' SULLIVAM, M. G.; THORNTON, G.; O' SULLIVAM, G. C.; COLLINS, J. K. Probiotic bacteria: myth or reality? **Trends in Food Science and Technology**, v. 3, p. 309-314, 1992.

OCAÑA, V. S.; HOLGADO, A. A. P. R.; NADER-MACÍAS, M. E. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 23, p. 87-92, 1999.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 279-289, 2002.

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v. 65, p. 859-867, 2003.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 1. ed. Goiânia: UFG, v. 2, 1996. 1110 p.

PENNA, A. L. B. Probióticos & Saúde. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (2002: Porto Alegre). **Anais**. Porto Alegre: SBCTA, 2002a. p. 4045-4046.

PENNA, A. L. B. Probióticos: uma alternativa para o setor lácteo. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (2002: Porto Alegre). **Anais**. Porto Alegre: SBCTA, 2002b. p. 4048-4050.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v. 67, p. 309-317, 2004.

PEREIRA, D. I.; GIBSON, G. R. Effects of consumption of Probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical Reviews on Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, p. 259-281, 2002.

PIDCOCK, K.; HEARD, G. M.; HENRIKSSON, A. Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p. 75-81, 2002.

PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; HEINEMANN, R. J. B. Bactérias envolvidas no processamento de produtos cárneos – uma revisão. **Boletim do SBCTA**, v. 35, n. 1-2, p. 109-116, 2001.

PLANTAFARMA. **Marcela-do-campo**. Plantas e ervas medicinais e fitoterápicos. Disponível em: <http://www.plantafarma.com.br/ESP/Achyrocline_satureioides.htm> Acesso em: 26 abr. 2005.

PONTES, D. S.; MIYOSHI, A.; DORELLA, F. A.; AZEVEDO, V. A. C. Bactérias do ácido láctico na produção de vacinas vivas de mucosa. In: **Prébióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 2003. 206 p.

PRÄNDL, O.; FISCHER, A.; SCHMIDHOFER, T.; SINELL, H. J. **Tecnología e Higiene de la Carne**. Zaragoza: Acribia, 1994. 854 p.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos**. 2. ed., Zaragoza: Acribia, 1994. 581 p.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Practice Residence on Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 849-859, 2003.

SÁ, F. V.; BARBOSA, M. **O leite e seus produtos**. 5. ed. Lisboa: Clássica, 1990. 520 p.

SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os métodos Simplate TPC-CI e Petrifilm AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvete. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 60-64, 2002.

SANTOS, F. L.; FERREIRA, C. L. L. F.; COSTA, N. M. B. Modulação da colesterolemia por meio de prebióticos e probióticos. In: **Prébióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 2003. 206 p.

SAMESHIMA, T.; MAGOME, C.; TAKESHITA, K.; ARIHARA, K.; ITOH, M.; KONDO, Y. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 1-7, 1998.

SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins, 1986. v. 2.

SENS, S. L. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos Xokleng da terra indígena Ibirama**. Florianópolis, 2002. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Produção), Universidade Federal de Santa Catarina.

SHAHIDI, E.; RUBIN, L. J.; DIOSADY, L. L.; WOOD, D. F. Effect of sulphanilamide on the TBA values of cured meats. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 274-275, 1985.

SILVA, T. J. P. Tecnologia da carne e derivados. **Curso de tecnologia da carne e derivados**. Curitiba: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, abril, 1997.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. Métodos de análise microbiológica de alimentos. **Manual Técnico, ITAL**, n. 14, 1995.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001, 317 p.

SIQUEIRA, S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: Embrapa, 1995. 159 p.

STAHNKE, L. H. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels – Part I. Chemical and bacteriological data. **Meat Science**, v. 41, n. 2, p. 179-191, 1995.

STANTON, C.; GARDINER, G.; MEEHAN, H.; COLLINS, K.; FITZGERALD, G.; LYNCH, P. B.; ROSS, R. P. Market potential for probiotics. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 476s-483s, 2001.

SWANSON, K. M.; BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; JOHSON, M. G. Colony Count Methods. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, p. 75-96, 1992.

TANAKA, H.; DOESBURG, K.; IWASAKI, T.; MIERAU, I. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2530-2535, 1999.

THARMARAJ, N.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2288-2296, 2003.

TARLADGIS, B. G.; PEARSON, A. M.; DUCAN JR, L. R. Chemistry of the 2-tiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. **Journal Science Food Agriculture Champaing**, v. 15, p. 602-607, 1964.

TERRA, A. B. M.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 152 p.

TERRA, N. N.; TERRA, A. B. M.; TERRA, L. M. **Defeitos nos produtos cárneos: origens e soluções**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 88 p.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: UNISINOS, 1998. 216 p.

TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação do salame**. Revista Nacional da Carne, n. 317, julho, 2003. Disponível em: <http://www.dipemar.com.br/carne/330/materia_tecnocarnes_carne.htm> Acesso em: 19 abr. 2005.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados. Técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Nobel, 1988. 121 p.

TERRA, N. N.; DE CARLI, E. M.; TELLES, M. M.; DREHMER, A. M. F.; QUADROS, C. P.; MALHEIROS, P. S.; WAGNER, R.; FRIES, L. L. M. Antioxidante natural na melhoria da qualidade do salame tipo italiano. In: 2º Simpósio em Ciência de Alimentos (2003: Florianópolis). **Anais**. Florianópolis: SBCTA, 2003.

TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M.; KUBOTA, E. H. **Natural antioxidants in mechanically deboned chicken meat and meat products protection**. Projeto de pesquisa. 2005. 22 p. Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos. Centro de Ciências Rurais. Universidade Federal de Santa Maria.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: **Prébióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 2003. 206 p.

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 233-244, 2003.

VALENTIM, C.; TESHIMA, E.; FERREIRA, C. L. L. F. Crescimento de bactérias bífidas em leite e em caldo MRS modificado com pH ajustado para diversos valores. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, (12: 1994, Juiz de Fora). **Anais**. Juiz de Fora: [s.n.], 1994. p. 49-53.

VEDAMUTHU, E. R.; RACCACH, M.; BONITA, A. G.; SEITZ, E. W.; REDDY, M. S. Acid-producing microorganisms. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992, p. 225-238.

VIJAYENDRA, S. V. N.; GUPTA, R. C. Therapeutic importance of bifidobacteria and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. **Indian Dairyman**, v. 44, n. 12, p. 595-599, 1992.

YABARRA, L. M.; COSTA, N. M. B.; GIBSON, G. R.; FERREIRA, C. L. L. F. Influência de probióticos e prebióticos na absorção de minerais. In: **Prébióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Célia L. L. F. Ferreira, 2003. 206 p.

YAMADA, E. A. Antioxidantes alternativos. **TecnoCarnes**, n. 330, p. 100, ago. 2004.

YAMADA, E. A. **Importância da qualidade das matérias-primas cárneas no processamento de embutidos**. Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes (CTC-ITAL), maio, p. 132-146, 2005.

ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; BATTAGLIA, A.; CHIZZOLINI, R. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. **Meat Science**, v. 66, p. 415-423, 2004.

ZEUTHEN, P. Historical aspects of meat fermentation. In: CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P. E. **Fermented Meats**. Glasgow: Chapman & Hall, 1995, p. 53-69.

ANEXOS

ANEXO 1 – FICHA DE RESPOSTA APRESENTADA AOS PROVADORES NA AVALIAÇÃO SENSORIAL DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS

NOME: _____ DATA: _____

Você está recebendo amostras de produto cárneo fermentado adicionado de bactérias lácticas probióticas. Utilize a escala abaixo como modelo para pontuar os atributos de acordo com sua intensidade e anote o valor correspondente à sua avaliação para cada amostra na tabela a seguir.

Atributos de qualidade

Gosto ácido

1____2____3____4____5____6____7____8____9
Fraco intermediário forte

Sabor

1____2____3____4____5____6____7____8____9
Ruim indiferente bom

Aroma

1____2____3____4____5____6____7____8____9
Fraco intermediário forte

Cor

1____2____3____4____5____6____7____8____9
Frac intermediária forte

Textura

1____2____3____4____5____6____7____8____9
Suave intermediária firme

Aspecto (aparência visual)

1____2____3____4____5____6____7____8____9
Ruim indiferente bom

Atributos	Amostra 115	Amostra 390	Amostra 586	Amostra 924
Gosto ácido				
Sabor				
Aroma				
Cor				
Textura				
Aspecto				

Ordene as amostras de acordo com a ordem de sua preferência

1°. _____ 2°. _____ 3°. _____ 4°. _____

ANEXO 2 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS E APRESENTADOS NO EXPERIMENTO 1

1 Determinação de pH/ tempo 25 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.481	3	0.160333	8.016667	0.0362651	6.591392
Dentro dos grupos	0.08	4	0.02			
Total	0.561	7				

2 Determinação da atividade de água/ tempo 25 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.0007375	3	0.000246	1.22916667	0.408494	6.591392321
Dentro dos grupos	0.0008	4	0.0002			
Total	0.0015375	7				

3 Determinação de umidade/ tempo 25 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	68.12647	3	22.70882	113544.1	0.0000	6.591392
Dentro dos grupos	0.0008	4	0.0002			
Total	68.12727	7				

4 Determinação de perda de peso/ tempo 25 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	21.8715	3	7.290502	36452.51	0.0000	6.591392
Dentro dos grupos	0.0008	4	0.0002			
Total	21.8723	7				

5 Determinação de perda de diâmetro/ tempo 25 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	14.56326	3	4.854419	942.6056	0.0000	6.591392
Dentro dos grupos	0.0206	4	0.00515			
Total	14.58386	7				

6 Contagem de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*/ tempo 25 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.194058	2	0.097029	601.8726	0.000124	9.552082
Dentro dos grupos	0.000484	3	0.000161			
Total	0.194542	5				

7 Avaliação sensorial/ tempo 25 dias

a) Gosto ácido

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	73.23611111	17	4.308006536	1.629648707	0.090851	1.827146
Tratamentos	31.93055556	3	10.64351852	4.026269702	0.012032	2.78623
Erro	134.8194444	51	2.643518519			
Total	239.9861111	71				

b) Sabor

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	58.44444444	17	3.437908497	1.074200136	0.402606	1.827146
Tratamentos	12.27777778	3	4.092592593	1.278761062	0.291586	2.78623
Erro	163.2222222	51	3.20043573			
Total	233.9444444	71				

c) Aroma

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	78.94444444	17	4.64379085	1.53070018	0.121421919	1.827146
Tratamentos	10.77777778	3	3.592592593	1.184201077	0.324996747	2.78623
Erro	154.7222222	51	3.033769063			
Total	244.4444444	71				

d) Cor

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	46.11111111	17	2.712418301	1.52200489	0.124511055	1.827146
Tratamentos	5.611111111	3	1.87037037	1.049511002	0.378745295	2.78623
Erro	90.88888889	51	1.782135076			
Total	142.6111111	71				

e) Textura

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provedores	70.61111111	17	4.153594771	1.7122	0.070969	1.827146
Tratamentos	12.77777778	3	4.259259259	1.7557	0.167391	2.78623
Erro	123.7222222	51	2.425925926			
Total	207.1111111	71				

f) Aspecto

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provedores	79.77777778	17	4.692810458	1.595555556	0.100481745	1.827146
Tratamentos	22	3	7.333333333	2.493333333	0.070417397	2.78623
Erro	150	51	2.941176471			
Total	251.7777778	71				

ANEXO 3 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS E APRESENTADOS NO EXPERIMENTO 2

1 Determinação de pH/ tempo 84 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1.614744	2	0.807372	679.0981	0.00000	3.682317
Dentro dos grupos	0.017833	15	0.001189			
Total	1.632578	17				

2 Determinação da atividade de água

a) Tempo 01 dia

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.000013	2	0.000006	1.5	0.353553	9.552082
Dentro dos grupos	0.000013	3	0.000004			
Total	0.000026	5				

b) Tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.004154	2	0.002077167	201.0161	0.000637	9.552082
Dentro dos grupos	0.000031	3	0.000010			
Total	0.004185	5				

c) Tempo 84 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.000097	2	0.000048	14.6	0.028438	9.552082
Dentro dos grupos	0.00001	3	0.0000033			
Total	0.000107	5				

3 Determinação de umidade

a) Tempo 1 dia

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	5.379633	2	2.689817	0.550927	0.625478	9.552082
Dentro dos grupos	14.64705	3	4.88235			
Total	20.02668	5				

b) Tempo 84 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	15.8283	2	7.91415	800.7572	0.000080	9.552082
Dentro dos grupos	0.02965	3	0.009883			
Total	15.85795	5				

4 Contagem de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei*/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1.833142	1	1.833142	806.8952	0.001237	18.51276
Dentro dos grupos	0.004544	2	0.002272			
Total	1.837685	3				

5 Contagem de *Pediococcus pentosaceus*/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.041917	2	0.020958	6.777757	0.077138	9.552082
Dentro dos grupos	0.009277	3	0.003092			
Total	0.051193	5				

6 Avaliação sensorial

a) Gosto ácido/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	62.148148	17	3.65577342	1.00449	0.477069	1.93320
Tratamentos	4.9259259	2	2.46296296	0.676743	0.514983	3.2759
Erro	123.74074	34	3.63943355			
Total	190.81481	53				

b) Gosto ácido/ tempo 84 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	95.5	17	5.61765	1.5872576	0.123156	1.933206
Tratamentos	9	2	4.5	1.2714681	0.293416	3.2759
Erro	120.3333	34	3.53922			
Total	224.8333	53				

c) Sabor/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	15.203703	17	0.894335512	0.374032	0.982932	1.93320
Tratamentos	8.0370370	2	4.018518519	1.680638	0.20136	3.2759
Erro	81.296296	34	2.391067538			
Total	104.53703	53				

d) Sabor/ tempo 84 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	45.33333	17	2.666666667	0.8784	0.601155	1.933206
Tratamentos	10.77778	2	5.388888889	1.775	0.184826	3.2759
Erro	103.2222	34	3.035947712			
Total	159.3333	53				

e) Aroma/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	21.92592593	17	1.289760349	0.309867	0.993687	1.933206
Tratamentos	4.481481481	2	2.240740741	0.538341	0.588609	3.2759
Erro	141.5185185	34	4.162309368			
Total	167.9259259	53				

f) Aroma/ tempo 84 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	74.59259	17	4.387799564	1.2254335	0.297713	1.933206
Tratamentos	18.92593	2	9.462962963	2.6428354	0.085735	3.2759
Erro	121.7407	34	3.580610022			
Total	215.2593	53				

g) Cor/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	30.81481481	17	1.812636166	0.654345	0.822879	1.933206
Tratamentos	63.81481481	2	31.90740741	11.51829	0.000152	3.2759
Erro	94.18518519	34	2.770152505			
Total	188.8148148	53				

h) Cor/ tempo 84 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	29.64815	17	1.744009	0.75412153	0.728004	1.933206
Tratamentos	59.37037	2	29.68519	12.836081	0.00007	3.2759
Erro	78.62963	34	2.312636			
Total	167.6481	53				

i) Textura/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	50.31481481	17	2.959694989	1.181304	0.328898	1.933206
Tratamentos	30.81481481	2	15.40740741	6.149565	0.005253	3.2759
Erro	85.18518519	34	2.505446623			
Total	166.3148148	53				

j) Textura/ tempo 84 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	42.148148	17	2.479302832	1.017434	0.465052	1.933206
Tratamentos	27.814815	2	13.90740741	5.707197	0.007292	3.2759
Erro	82.851852	34	2.436819172			
Total	152.81481	53				

l) Aspecto/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	28.16666667	17	1.656862745	0.655886	0.821514	1.933206
Tratamentos	2.777777778	2	1.388888889	0.549806	0.582106	3.2759
Erro	85.88888889	34	2.526143791			
Total	116.8333333	53				

m) Aspecto/ tempo 84 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	48.31481	17	2.84204793	0.751873199	0.730253	1.933206
Tratamentos	5.481481	2	2.740740741	0.725072046	0.491627	3.2759
Erro	128.5185	34	3.779956427			
Total	182.3148	53				

ANEXO 4 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS
DETERMINAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E
SENSORIAIS DOS EMBUTIDOS FERMENTADOS E APRESENTADOS
NO EXPERIMENTO 3

1 Determinação de pH/

a) Tempo 03 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	0.002619	3	0.000873	0.599428	0.63135	3.862539
Tratamentos	1.035619	3	0.345206	237.0515	0.00000	3.862539
Erro	0.013106	9	0.001456			
Total	1.051344	15				

b) Tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	0.129	3	0.043	2.522	0.123	3.86
Tratamentos	2.253	3	0.751	44.08	0.0001	3.86
Erro	0.153	9	0.017			
Total	2.536	15				

2 Determinação da atividade de água/ tempo 178 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	0.00006	3	0.000020	1.23946	0.351446	3.862539
Tratamentos	0.001942	3	0.000647	39.30354	0.000016	3.862539
Erro	0.000148	9	0.000016			
Total	0.002152	15				

3 Determinação de umidade/ tempo 178 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	2.06045	1	2.06045	1.86542	0.265383	10.12796
Tratamentos	48.59765	3	16.19922	14.6659	0.026848	9.276619
Erro	3.31365	3	1.10455			
Total	53.97175	7				

4 Determinação de perda de peso/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	0.966968	1	0.966968	14.72113	0.031217	10.12796
Tratamentos	88.11723	3	29.37241	447.1658	0.000179	9.276619
Erro	0.197057	3	0.065686			
Total	89.28126	7				

5 Determinação de perda de diâmetro/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	0.007586	1	0.007586	0.066239	0.813538	10.12796
Tratamentos	22.10923	3	7.369743	64.35051	0.003199	9.276619
Erro	0.343575	3	0.114525			
Total	22.46039	7				

6 Determinação de proteínas

a) Tempo 01 dia

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	2.42	1	2.42	3.705216	0.149915	10.12796
Tratamentos	1.16	3	0.386667	0.592018	0.661341	9.276619
Erro	1.9594	3	0.653133			
Total	5.5394	7				

b) Tempo 28 dias

Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Blocos	9.1592	1	9.1592	5.928924	0.092919	10.12796
Tratamentos	13.50105	3	4.50035	2.913162	0.201641	9.276619
Erro	4.6345	3	1.544833			
Total	27.29475	7				

c) Tempo 178 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	0.784378	1	0.784378	0.142775	0.730688	10.12796
Tratamentos	38.90507	3	12.96836	2.360542	0.249485	9.276619
Erro	16.48142	3	5.493805			
Total	56.17087	7				

7 Determinação de lipídeos/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	1.044012	1	1.044012	9.066872	0.057161	10.12796
Tratamentos	24.08024	3	8.026746	69.70939	0.002843	9.276619
Erro	0.345438	3	0.115146			
Total	25.46969	7				

8 Oxidação lipídica/ valores de TBA

a) Tempo 01 dia

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	0.0026405	1	0.0026	1.73037543	0.27986	10.12796
Tratamentos	0.0666522	3	0.0222	14.559727	0.02712	9.276619
Erro	0.0045778	3	0.0015			
Total	0.0738705	7				

b) Tempo 78 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	0.000386	1	0.0004	2.611511	0.204508	10.12796
Tratamentos	0.587026	3	0.196	1324.799	0.000035	9.276619
Erro	0.000443	3	0.0001			
Total	0.587855	7				

c) Tempo 178 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	0.003304	3	0.001101	1.065585	0.410981	3.862539
Tratamentos	0.029636	3	0.009879	9.55814	0.003693	3.862539
Erro	0.009302	9	0.001034			
Total	0.042241	15				

9 Determinação de L*

a) Tempo 01 dia

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	29.1437	4	7.2859	2.16672486	0.134743	3.2592
Tratamentos	14.1305	3	4.7102	1.40073786	0.290435	3.4903
Erro	40.3517	12	3.3626			
Total	83.6259	19				

b) Tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	3.90727	4	0.9768	0.25413133	0.901595	3.2592
Tratamentos	96.9659	3	32.322	8.40896858	0.002798	3.4903
Erro	46.125	12	3.8438			
Total	146.998	19				

c) Tempo 50 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	36.459	4	9.115	2.7181	0.0803	3.25916
Tratamentos	99.347	3	33.12	9.87548	0.0015	3.4903
Erro	40.24	12	3.353			
Total	176.05	19				

d) Tempo 78 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	8.03237	4	2.0081	1.283	0.33051	3.2592
Tratamentos	115.19	3	38.397	24.52	0.000021	3.4903
Erro	18.78835	12	1.5657			
Total	142.01072	19				

e) Tempo 133 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	11.595	4	2.899	2.06711	0.1485	3.25916
Colunas	302.07	3	100.7	71.8011	0.00000	3.4903
Erro	16.828	12	1.402			
Total	330.49	19				

f) Tempo 178 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	9.5942	4	2.399	2.9338	0.0662	3.25916
Colunas	230.14	3	76.71	93.8339	0.00000	3.4903
Erro	9.8107	12	0.818			
Total	249.55	19				

10 Determinação de a*

a) Tempo 01 dia

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	2.30895	4	0.5772	0.32693792	0.85458	3.2592
Tratamentos	31.7374	3	10.579	5.99184407	0.009776	3.4903
Erro	21.187	12	1.7656			
Total	55.2334	19				

b) Tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	13.1976	4	3.2994	3.25175697	0.050315	3.2592
Tratamentos	10.3247	3	3.4416	3.39188997	0.053819	3.4903
Erro	12.1758	12	1.0146			
Total	35.6981	19				

c) Tempo 50 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	1.58488	4	0.3962	0.141	0.96368	3.2592
Tratamentos	0.755815	3	0.2519	0.09	0.96441	3.4903
Erro	33.76036	12	2.8134			
Total	36.101055	19				

d) Tempo 78 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Blocos	1.3802	4	0.345	0.5217	0.7218	3.25916
Tratamentos	37.089	3	12.36	18.6927	0.00008	3.4903
Erro	7.9365	12	0.661			
Total	46.405	19				

e) Tempo 133 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	13.42352	4	3.3559	3.095	0.05757	3.2592
Colunas	3.383215	3	1.1277	1.04	0.41008	3.4903
Erro	13.01356	12	1.0845			
Total	29.820295	19				

f) Tempo 178 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	0.72427	4	0.1811	1.30604995	0.322461	3.2592
Colunas	5.6054	3	1.8685	13.477354	0.000378	3.4903
Erro	1.66365	12	0.1386			
Total	7.99332	19				

11 Contagem de *Lactobacillus*

a) Tempo 01 dia

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	0.0526991	1	0.0526991	2.3921896	0.219675261	10.1279625
Colunas	7.8243884	3	2.6081295	118.39176	0.001298055	9.27661858
Erro	0.066089	3	0.0220297			
Total	7.9431765	7				

b) Tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	0.0006864	1	0.0006864	3.6787568	0.150932682	10.1279625
Colunas	1.1110813	3	0.3703604	1985.0576	0.000019	9.27661858
Erro	0.0005597	3	0.0001866			
Total	1.1123274	7				

12 Contagem de *Pediococcus pentosaceus*/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	0.301873182	3	0.100624	2.294411	0.146584	3.862539
Colunas	1.522576863	3	0.507526	11.57246	0.001922	3.862539
Erro	0.394706834	9	0.043856			
Total	2.21915688	15				

13 Avaliação sensorial

a) Gosto ácido/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	14.7361111	17	0.86683	0.447616	0.964469	1.827146
Tratamentos	16.4861111	3	5.49537	2.837716	0.047088	2.78623
Erro	98.7638888	51	1.936547			
Total	129.986111	71				

b) Sabor/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	40.5	17	2.382352	0.919293	0.55679863	1.827146
Tratamentos	57.3333333	3	19.11111	7.374527	0.00033869	2.78623
Erro	132.166666	51	2.591503			
Total	230	71				

c) Sabor/ tempo 78 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	42.11111111	17	2.477124183	1.29794521	0.231785	1.82714643
Tratamentos	17.66666667	3	5.888888889	3.08561644	0.035303	2.78622991
Erro	97.33333333	51	1.908496732			
Total	157.1111111	71				

d) Aroma/ tempo 78 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	42.9444444	17	2.526144	0.983044	0.490590	1.827146
Tratamentos	89.9444444	3	29.98148	11.66723	0.000006	2.78623
Erro	131.055555	51	2.569717			
Total	263.944444	71				

e) Cor/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	23.90278	17	1.4060457	0.951354	0.52312	1.827146
Tratamentos	92.375	3	30.791666	20.83416	0.00000	2.78623
Erro	75.375	51	1.4779411			
Total	191.6528	71				

f) Cor/ tempo 78 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	29.56944	17	1.7393790	0.771842	0.71490	1.827146
Tratamentos	114.8194	3	38.273148	16.98356	0.00000	2.78623
Erro	114.9306	51	2.2535403			
Total	259.3194	71				

g) Cor/ tempo 133 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	42.402777	17	2.4942810	0.971983	0.50184	1.827146
Tratamentos	74.375	3	24.791666	9.660936	0.00003	2.786229
Erro	130.875	51	2.5661764			
Total	247.65277	71				

h) Cor/ tempo 178 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	62.56944	17	3.680556	1.494526	0.134742	1.827146
Tratamentos	40.15278	3	13.38426	5.434811	0.002546	2.78623
Erro	125.5972	51	2.462691			
Total	228.3194	71				

i) Textura/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	29	17	1.7058823	0.93214	0.543222	1.827146
Tratamentos	113.666666	3	37.888888	20.7035	0.000006	2.78623
Erro	93.3333333	51	1.8300653			
Total	236	71				

j) Textura/ tempo 78 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	57.2361111	17	3.3668300	0.94036	0.534587	1.827146
Tratamentos	122.152777	3	40.717592	11.3725	0.000008	2.78623
Erro	182.597222	51	3.5803376			
Total	361.986111	71				

l) Textura/ tempo 133 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	50.77777778	17	2.986928	1.25895317	0.25667311	1.827146434
Tratamentos	66	3	22	9.27272727	0.0000536132	2.786229913
Erro	121	51	2.372549			
Total	237.7777778	71				

m) Textura/ tempo 178 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	126.9028	17	7.464869	1.891588	0.040987	1.827146
Tratamentos	24.48611	3	8.162037	2.068249	0.115983	2.78623
Erro	201.2639	51	3.946351			
Total	352.6528	71				

n) Aspecto/ tempo 28 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	33.61111111	17	1.97712418	0.570575291	0.89801643	1.827146
Tratamentos	30.27777778	3	10.0925926	2.912606099	0.04315644	2.78623
Erro	176.7222222	51	3.46514161			
Total	240.6111111	71				

o) Aspecto/ tempo 78 dias

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Provadores	16.5694444	17	0.974673	0.390593	0.9818628	1.827146
Tratamentos	73.4861111	3	24.49537	9.816327	0.0000323	2.78623
Erro	127.263888	51	2.49537			
Total	217.319444	71				

ANEXO 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS APRESENTADOS NO TESTE DE RESISTÊNCIA DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* AO BAIXO pH E AOS SAIS BILIARES

1 Resistência ao baixo pH

a) Tempo 0 hora

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.025269	2	0.012635	3.815115	0.149923	9.552082
Dentro dos grupos	0.009935	3	0.003312			
Total	0.035205	5				

b) Tempo 4 horas

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.130059	2	0.065029	11.26433	0.040285	9.552082
Dentro dos grupos	0.017319	3	0.005773			
Total	0.147378	5				

2 Resistência aos sais biliares/ tempo 4 horas

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.425842	2	0.212921	27.25567	0.011914	9.552082
Dentro dos grupos	0.023436	3	0.007812			
Total	0.449278	5				